



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**“ENSAYO BIOTECNOLÓGICO DE RESIDUOS
AGROINDUSTRIALES DE CACAO (*Theobroma cacao*) Y GUINEO
(*Musa paradisiaca*) COMO SUSTRATOS PARA LA OBTENCIÓN
DE VITAMINA B2 EMPLEANDO *Saccharomyces cerevisiae*”**

Trabajo de titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: DIANA ALEJANDRA MOREIRA MATA

DIRECTORA: DRA. JENNY MARINA MORENO MORA

Riobamba-Ecuador
2019

©2019, Diana Alejandra Moreira Mata

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El tribunal de la Unidad de Titulación certifica que el trabajo de investigación: "ENSAYO BIOTECNOLÓGICO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE CACAÓ (*Theobroma cacao*) Y GUINEO (*Musa paradisiaca*) COMO SUSTRATOS PARA LA OBTENCIÓN DE VITAMINA B2 EMPLEANDO *Saccharomyces cerevisiae*", de responsabilidad de la señorita Diana Alejandra Moreira Mata, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros de la Unidad de Titulación, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Juan Carlos González García PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2019-10-23
Dra. Jenny Marina Moreno Mora DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2019-10-23
Dra. Yolanda Dolores Díaz Heredia MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2019-10-23

Yo, Diana Alejandra Moreira Mata soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Diana Alejandra Moreira Mata

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Diana Alejandra Moreira Mata, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Diana Alejandra Moreira Mata

CI: 230007437-0

DEDICATORIA

A mis padres Washington Jesús Moreira Moreira y Araceli Piedad Mata Uribe, que me apoyaron incondicionalmente en cada uno de mis pasos, a mi hermana Verónica Moreira por haber sido mi compañía y soporte en los días difíciles.

Diana

AGRADECIMIENTO

Primero el agradecimiento a Dios por darme las fuerzas, ánimos, protección y salud para completar la carrera. A mis padres por haberme apoyado cada día para ser mejor.

A la Dra. Jenny Moreno Mora tutora del trabajo, por su ayuda constante, competencia y apoyo importante en la realización de este trabajo de titulación, quien fue la primera persona con la que se desarrolló la idea de investigación y aportó con su conocimiento y buen humor a iniciar y culminar este trabajo de investigación.

A la Dra. Yolanda Díaz asesora del trabajo, por su permanente asesoramiento, competencia y apoyo en la realización de este trabajo de titulación y por la buena amistad establecida.

A la Bqf. Yolanda Buenaño e Ing. Carla Haro por el apoyo brindado en su laboratorio y por su importante guía en el uso de equipos para los análisis necesarios.

Diana Moreira

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1.	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	6
1.1	Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	8
1.2	Morfología del cacao	8
1.3	Cáscaras de cacao	8
1.4	Variabilidad del cacao	9
1.5	Usos del Cacao	11
1.6	Producción del cacao	11
1.7	Residuos Agroindustriales del Cacao	12
1.8	Guineo (<i>Musa paradisiaca</i>).....	12
1.8.1	Taxonomía del guineo	13
1.8.2	Cáscara de Guineo	13
1.8.3	Usos del guineo	14
1.8.4	Residuos del guineo.....	14
1.9	Métodos de caracterización	15
1.9.1	Determinación de la humedad	15
1.9.2	Determinación de las cenizas.....	15
1.9.3	Determinación de proteínas: Método kjeldahl.....	15
1.9.4	Determinación de grasas.....	15
1.9.5	Método soxhlet	16
1.10	Fermentación	16
1.10.1	Fermentación aerobia	16
1.11.	Biorreactores.....	17
1.11.1	Biorreactor batch	18
1.11.2	Nutrientes en Biorreactores	18
1.11.3	Microorganismos en Biorreactores.....	18
1.12	Ciclo del crecimiento de microorganismos	19
1.13	Levaduras.....	19
1.13.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20

1.13.2	Condiciones de crecimiento de <i>Saccharomyce cerevisiae</i>	20
1.13.3	Uso de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.14	Vitaminas.....	20
1.15	Vitaminas del Complejo B.....	21
1.16	Riboflavina	21
1.16.1	Obtención de riboflavina	21
1.17	Métodos de Identificación de Compuestos.....	23
1.17.1	Cromatografía en capa fina.....	23
1.17.2	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	23

CAPÍTULO II:

2.	MARCO METODOLÓGICO	25
2.1	Tipo y diseño de la investigación	25
2.1.1	Unidad de análisis.....	25
2.1.2	Población de estudio.....	25
2.1.3	Tamaño de la muestra.....	25
2.1.4	Método de muestreo	25
2.1.5	Hipótesis y especificación de variables	26
2.1.6	Identificación variables.....	26
2.1.7	Obtención de residuos de cacao.....	26
2.1.8	Obtención de residuos de guineo.....	26
2.2	Primera Etapa: Caracterización de los residuos agroindustriales de cacao y guineo... 26	
2.2.1	Análisis gravimétrico. de cenizas	26
2.2.2	Análisis de Humedad por gravimetría	27
2.2.3	Análisis de proteínas: Método macrokjeldhal	27
2.2.4	Análisis de grasas: Extracción en Soxhlet.....	28
2.2.5	Análisis simple para determinar presencia de bacterias, hongos y levaduras en los residuos agroindustriales de cacao y guineo.....	28
2.3	Segunda Etapa: Ensamblaje de los biorreactores prototipo.....	29
2.3.1	Montaje de los biorreactores prototipo	29
2.4	Tercera Etapa: Control de presencia de riboflavina.....	30
2.4.1	Control por medio de cromatografía en capa fina	30
2.4.2	Control por medio de HPLC.....	30
2.5	Quinta Etapa Análisis estadístico	31

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	32
3.1	Caracterización de los residuos.	32
3.1.1	Determinación de cenizas en cacao y guineo	32
3.1.2	Determinación de humedad en cacao y guineo	32
3.1.3	Control microbiológico de residuos de cacao y guineo.	33
3.1.4	Determinación de porcentaje de proteína residuos de cacao y guineo	33
3.1.5	Determinación de porcentaje de grasa en cacao y guineo	34
3.2	Fermentación de Residuos de Cacao y Guineo	35
3.2.1	Curva de crecimiento de las fermentaciones	35
3.3.1	Análisis por cromatografía en capa fina de las fermentaciones.....	39
3.3.2	HPLC de las fermentaciones de los residuos de cacao y guineo.	42
3.3.1	Prueba De Normalidad Shapiro Wilk, para los resultados HPLC de las concentraciones de Riboflavina de las fermentaciones.	45
3.3.2	Prueba de homogeneidad de las concentraciones de riboflavina de las fermentaciones.	46
3.3.3	Análisis de Varianza de ANOVA para los resultados HPLC de las concentraciones de las fermentaciones.	47
3.3.4	Comparación de parejas de tratamientos para los resultados HPLC de las concentraciones de riboflavina de las fermentaciones.....	48
	CONCLUSIONES.....	50
	RECOMENDACIONES.....	51
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Composición Química de la Cáscara de Cacao	9
Tabla 2-1: Exportaciones totales del Ecuador de los últimos cinco años	12
Tabla 3-1: Composición química de la cáscara de banano	14
Tabla 4-1: Microorganismos Productores de Riboflavina	233
Tabla 1-3: Determinación de cenizas de residuos de cacao y guineo.....	32
Tabla 2-3: Determinación de humedad en residuos de cacao y guineo.	32
Tabla 3-3: Análisis microbiológicos en residuos de cacao y guineo.	33
Tabla 4-3: Porcentaje de proteína en residuos de cacao y guineo.....	33
Tabla 5-3: Porcentaje de grasa en residuos de cacao y guineo.	34
Tabla 6-3: Curva de crecimiento microbiano en las fermentaciones de residuos de cacao en UFC	35
Tabla 7-3: Curva de crecimiento microbiano en las fermentaciones de residuos de cacao y guineo en UFC.	36
Tabla 8-3: Curva de crecimiento microbiano en las fermentación de residuos de guineo en UFC.....	388
Tabla 9-3: Cromatografía en capa fina en fermentaciones de residuos de Cacao.....	40
Tabla 10-3: Cromatografía en capa fina en fermentaciones de residuos de cacao y guineo.....	40
Tabla 11-3: Cromatografía en capa fina en fermentaciones de residuos de guineo.....	41
Tabla 12-3: Concentración de riboflavina en las fermentaciones de residuos de cacao.	43
Tabla 13-3: Concentración de riboflavina de las fermentaciones de residuos de cacao y guineo.	44
Tabla 14-3: Concentración de riboflavina de las fermentaciones de residuos de Guineo.	45
Tabla 15-3: ANOVA de las concentraciones de riboflavina de las fermentaciones de residuos de cacao, cacao-guineo y guineo.....	47
Tabla 16-3: Tabla de Tukey para Fermentaciones de residuos de residuos de Cacao, cacao-guineo y guineo.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Clasificación de formas del Cacao.....	10
Figura 2-1: Clasificación de los usos del cacao	11
Figura 3-1: Proceso de fermentación	166
Figura 1-3: Cromatografía en capa fina de fermentaciones de residuos de cacao, con muestra patrón de riboflavina.....	39
Figura 2-3: Cromatograma de riboflavina (vitamina B ₂) de fermentación de residuos de cacao (0.1 mg/100g).....	42
Figura 3-3: Cromatograma de riboflavina (vitamina B ₂) de fermentación de residuos de cacao y guineo (0.05 mg/100g)	43
Figura 4-3: Cromatograma de Riboflavina (Vitamina B ₂) de Fermentación de residuos de Guineo (0.05 mg/100g).....	44

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Curva de crecimiento microbiano en la fermentación de residuos de cacao.....	35
Gráfico 2-3: Curva de crecimiento microbiano en la fermentación de residuos de Cacao y Guineo.....	37
Gráfico 3-3: Curva de crecimiento de fermentación de residuos de guineo.	38
Gráfico 4-3: Estadístico de Prueba de la Prueba de Normalidad para los resultados HPLC de las concentraciones de Riboflavina de las fermentaciones.	46
Gráfico 5-3 : Prueba de homogeneidad de las concentraciones de riboflavina de las fermentaciones.	46
Gráfico 6-3: Prueba de Tukey para los resultados HPLC de las concentraciones de riboflavina de las fermentaciones de residuos de cacao, guineo-cacao y guineo.....	48
Gráfico 7-3: Prueba de diferencia de los resultados HPLC de las concentraciones de riboflavina de las fermentaciones de residuos de cacao, guineo-cacao y guineo.	49

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Caracterización de los residuos agroindustriales de Cacao y Guineo.

ANEXO B: Fermentación de los Residuos Agroindustriales de Cacao y Guineo.

ANEXO C: Análisis de los Resultados de la Fermentación de Cacao, Cacao- Guineo y Guineo.

ANEXO D: Resultados HPLC de las Fermentaciones.

RESUMEN

Por medio de la presente investigación es posible resolver uno de los graves problemas que tiene nuestro país con los residuos agroindustriales procedentes del Cacao (*Theobroma cacao*) y del Guineo (*Musa paradisiaca*), utilizándolos para producir vitamina B₂. El objetivo de esta investigación es, por medio de ensayos biotecnológicos, obtener riboflavina a partir de estos residuos a través de la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*. De la caracterización de los residuos, se determina que por su contenido de nutrientes, son aptos para realizar los ensayos de fermentaciones de los residuos de cacao, la combinación de residuos de guineo y cacao y fermentación de residuos de guineo, empleando fermentadores prototipo tipo batch y con aireación constante, con 500 g de residuo en caldo. Por medio de Cromatografía en Capa Fina con eluyente: metanol, agua, amonio; se comprobó la presencia de riboflavina en los residuos fermentados, con un R_f de 0.91, coincidente con el estándar de riboflavina. Con la técnica HPLC se obtuvo una concentración de riboflavina promedio de 0.092, 0.048, 0.068 (mg/100g) en la fermentación de los sustratos Cacao, Cacao-Guineo y Guineo respectivamente. Por lo cual se concluye que es posible obtener la vitamina B₂ (riboflavina) por fermentación de estos residuos agroindustriales con *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentación de cacao fue la más efectiva obteniéndose el máximo de las concentraciones de 0.01 mg/100g. Para mejorar la producción de esta vitamina se podría probar a enriquecer los caldos de fermentación.

Palabras Clave: BIOTECNOLOGÍA, CACAO (*Theobroma cacao*), GUINEO (*Musa paradisiaca*), RIBOFLAVINA, *Saccharomyces cerevisiae*, CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA, CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC), FERMENTACIÓN, FERMENTADORES TIPO BATCH.

ABSTRACT

Through this research, it is possible to solve one of the most serious problems that our country has with agroindustrial waste from Cacao (*Theobroma cacao*) and Banana (*Musa paradisiaca*), using them to produce vitamin B₂. The objective of this research is, through biotechnological tests, to obtain riboflavin from these residues through fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. From the characterization of the residues, it is determined that due to their nutrient content, they are suitable for carrying out the fermentation tests of the cocoa residues, the combination of Banana and cocoa residues and fermentation of banana residues, by using prototype batch type fermenters and with constant aeration, with 500 g of broth residue. By means of thin-layer chromatography with eluent: methanol, water, ammonium; the presence of riboflavin in the fermented residues was verified, with a R_f of 0.91, coinciding with the riboflavin standard. With the HPLC technique, an average riboflavin concentration of 0.092, 0.048, 0.068 (mg / 100g) was obtained in the fermentation of the cocoa, cocoa-Banana and Banana substrates respectively. Therefore, it is concluded that it is possible to obtain vitamin B₂ (riboflavin) by fermentation of these agroindustrial residues with *Saccharomyces cerevisiae*. Cocoa fermentation was the most effective, obtaining the maximum concentrations of 0.01 mg/100g. So to improve the production of this vitamin we could try enriching the fermentation broths.

keywords: BIOTECHNOLOGY, COCOA (*Theobroma cacao*), BANANA (*Musa paradisiaca*), RIBOFLAVIN, *Saccharomyces cerevisiae*, HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC), FERMENTATION, BATCH TYPE MODE FERMENTERS.



INTRODUCCIÓN

La producción de vitaminas es de gran importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. Esta situación conlleva a los investigadores a la búsqueda de procesos de producción amigables con la naturaleza y a la exploración de métodos más eficientes y económicos que brinden garantías de sostenimiento a la industria química. La biotecnología es una alternativa sustancial para resolver esta contrariedad ya que ésta hace uso de microorganismos eficientes capaces de transformar diferentes sustratos en metabolitos que sirven como materia prima en diversos procesos de producción industrial a bajo costo, con mayores rendimientos y sin causar daño al ambiente (Benítez, 2016, p. 15). Los residuos agroindustriales poseen un alto potencial para ser aprovechados en diferentes procesos que incluyen elaboración de nuevos productos. El uso de estos residuos permite dar solución a diferentes problemáticas ambientales originadas, tanto por la generación y disposición de estos residuos, como por otros factores producto del desarrollo de otros sectores productivos. De igual manera, posibilita disminuir el uso de recursos naturales renovables y no renovables como materia prima para la producción de ciertos productos, generar empleo y recursos económicos (Corredor, 2018, p. 59). En la explotación cacaotera sólo se aprovecha económicamente la semilla, que representa aproximadamente un 10% de la masa del fruto fresco (Franco-Castillo, 2010, p. 45). Ecuador es un país de alta producción de cacao, 236 mil toneladas métricas de cacao en grano se producen anualmente (ANECACAO, 2019, p. 1). El grano de cacao es utilizado principalmente para la fabricación del chocolate; sin embargo, en el procesamiento del grano se generan residuos, tales como cáscaras, cascarillas y efluentes de fermentación, que representan hasta el 74-86% (en peso) de la mazorca. Las cáscaras de cacao son ricas en carbohidratos, fibra, proteínas, pectina y compuestos bioactivos (por ejemplo, los polifenoles y carotenoides). En cuanto al perfil de polifenoles los resultados muestran que en los extractos de la cáscara de cacao de diferentes genotipos contienen (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidinas B₁ y B₂, ácido gálico, galocatequina, (Lara, 2001, p-9)

Por otro lado, el guineo equivale al 10% de todas las exportaciones y como segundo rubro de mayor exportación de Ecuador, esta fruta es de las más apetecidas al formar parte de la dieta diaria.

Ecuador tiene al momento 162.234 hectáreas sembradas de Banano y cuenta con 4.473 productores de la fruta, de ellos se generan cerca del 95% de residuos vegetales, ya que por lo general sólo se utiliza el fruto para la comercialización y consumo, mientras que las demás partes de la planta como las cáscaras o piel del plátano no son aprovechados por el cultivador (Ministerio Comercio Exterior, 2017, p. 1). El mayor valor nutritivo lo poseen las cáscaras de plátano, tanto

verde como maduro, ya que presentan porcentajes elevados de humedad, grasa, proteína, fibra cruda y ceniza (Cortez, 2003, p. 4); siendo así una fuente de vitamina B₂. La Riboflavina o vitamina B₂ utilizada para el consumo humano se produce comercialmente por síntesis química, pero se ha demostrado que los procesos fermentativos con el empleo de microorganismos, son procesos. Esta vitamina es de gran importancia en el tratamiento terapéutico y es parte importante de la alimentación en general.

JUSTIFICACIÓN

Los avances en biotecnología industrial ofrecen oportunidades potenciales para la utilización económica de residuos agroindustriales como de cacao y guineo, Debido a su rica naturaleza orgánica y bajo contenido de cenizas, puede servir como un sustrato ideal para procesos microbianos para la producción de productos de valor agregado.

Según Araujo, (2010), una alternativa a la reutilización de esta materia prima sin valor comercial es como sustrato para fines biotecnológicos, en particular, la fermentación. Este importante bioprocesamiento se caracteriza por el crecimiento microbiano, en presencia de pequeñas cantidades de fluido libre, utilizando los nutrientes y elementos residuales presentes en estos residuos. Aunque esta técnica biotecnológica se conoce desde hace siglos, ha despertado un renovado interés por parte de los investigadores y las industrias de todo el mundo. En el país han sido testigos de un interés sin precedentes en la fermentación para el desarrollo de un gran número de bioprocesos, debido a una serie de ventajas, especialmente en términos de la reutilización beneficiosa de residuos sólidos y la producción de biomasa, entre éstos podemos destacar la producción de vitamina B₂ o riboflavina que a partir de estos residuos podría ser altamente beneficiosa para la industria ecuatoriana debido a sus características; Para la industria según Bustillo *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo productor de vitamina B₂ que bajo condiciones fermentativas apropiadas puede producir eficientemente el resultado deseado. (Mejía, 2008, p-19)

La riboflavina es una vitamina ampliamente distribuida en el reino vegetal y animal, la síntesis de riboflavina por microorganismos puede ser dividida según el grado de acumulación de la vitamina; así, se encuentran sobreproducciones débiles, moderadas y fuertes, tal como la presentan varias bacterias, algunas levaduras y hongos entre los cuales *Saccharomyces cerevisiae* es un productor moderado, pero altamente usado gracias a su facilidad de uso en la fermentación y buen desarrollo en la industria (Lara, 2001, p-10)

Esta vitamina es de gran importancia terapéutica y alimenticia, es utilizada para el consumo humano, la cual es producida comercialmente por síntesis química, los procesos fermentativos con el empleo de microorganismos, originan la forma que tiene aplicación como suplemento en los piensos concentrados para la alimentación animal, este es un proceso mucho más económico que la síntesis química y no ha sido explotado a cabalidad. (Lara, 2001, p-11)

La generación de residuos agroindustriales sólidos, líquidos y/o gaseosos, constituyen focos potenciales de contaminación y riesgo para la salud, si no son reutilizados o procesados

apropiadamente. De acuerdo con Vargas algunos de éstos son quemados o vertidos en rellenos sanitarios produciendo una gran liberación de dióxido de carbono (CO₂), contaminación de cursos de aguas, molestias por presencia de olores, proliferación de ratas, moscas y otros insectos entre otros. La generación de estos residuos puede ocurrir durante los procesos relacionados con el cultivo y/u obtención de materia prima o en las actividades de procesamiento de la misma. Si éstos no son reciclados o dispuestos apropiadamente, originan diversos impactos ambientales adversos, generando según Pérez contaminación principalmente en el suelo y el agua, tanto en fuentes superficiales o subterráneas, adicionalmente en menor proporción, contaminación en la atmósfera por las emisiones provenientes de la operación agroindustrial que pueden incluir material particulado, óxido de azufre, óxidos nitrosos, hidrocarburos y otros compuestos orgánicos. (Alcocer, 1993, p. 18)

Bernal sugiere que una gran variedad de estudios han propuesto alternativas para el aprovechamiento de las cáscaras de cacao en las que se destacan: uso para la alimentación de porcinos, uso como agente antibacterial, producción de antioxidantes y últimos estudios han hallado su aplicación como principal ingrediente en la formulación de galletas con alto contenido de fibra. (Ramírez, 2014, pp. 36-52)

Esta alternativa proporciona una perspectiva deseable al tratamiento y/o aprovechamiento de los residuos, la posibilidad de obtener ganancias adicionales, desde el punto de vista económico, es altamente rentable al sistema de tratamiento a la vez que contribuye notablemente a disminuir el grave impacto ambiental que estos residuos ocasionan.

OBJETIVOS:

Objetivo General

- Realizar ensayos biotecnológicos de residuos agroindustriales como sustratos para la obtención de vitamina B₂ empleando *Saccharomyces Cerevisiae*.

Objetivos Específicos

- Caracterizar física, química y microbiológicamente los residuos agroindustriales de Cacao (*Theobroma cacao*) y Guineo (*Musa paradisiaca*).
- Adaptar las unidades experimentales para el desarrollo de la fermentación de vitamina B₂ con los residuos de Cacao (*Theobroma cacao*) y Guineo (*Musa paradisiaca*) empleando *Saccharomyces Cerevisiae*.
- Evaluar el producto obtenido a partir de la fermentación de los residuos agroindustriales usados con cromatografía en capa fina y HPLC.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

Teniendo en cuenta la creciente población mundial y la desaparición de materias primas, junto a una amenaza real de la reducción de las fuentes de alimentos, no es sorprendente que aumente la conciencia sobre las necesidades de conservación y reutilización de los materiales que se tratan como desechos. Las cáscaras de cacao son sólo uno de los ejemplos de subproductos con componentes que se han descartado, aunque podrían reutilizarse de muchas maneras (Balentić, 2018). La producción química de riboflavina, utilizada con éxito durante décadas, está siendo reemplazada por procesos microbianos. Éstos prometen ahorrar la mitad de los costos, reducir los residuos y los requisitos de energía, y utilizar recursos renovables como el azúcar o el aceite vegetal (Stahmann, 2000).

La riboflavina utilizada para el consumo humano se produce comercialmente por síntesis química, los procesos fermentativos con el empleo de microorganismos, originan la forma que tiene aplicación como suplemento en los concentrados para la alimentación animal. Este es un proceso mucho más económico que la síntesis química. La deficiencia de riboflavina en el hombre causa dermatitis, fotofobia, conjuntivitis y pelagra. Algunos animales como ocurre con los cerdos pueden sufrir déficit de esta vitamina lo que les causa inapetencia, parálisis, diarrea, torpeza de movimientos. En las aves causa retracción extrema de la cabeza, parálisis deformante de los dedos de las patas y retraso en la salida de las plumas. (Lara, 2001, p-9)

Las vitaminas y los biofactores relacionados pertenecen a esos pocos químicos con un atractivo directo para las personas. De hecho, existe una gran necesidad de vitaminas adicionales, además de las derivadas de fuentes de alimentos de origen vegetal y animal, debido a hábitos o procesos de alimentación desequilibrados, escasez de alimentos o enfermedades. Las vitaminas agregadas ahora se preparan químicamente o biotecnológicamente mediante procesos de fermentación o bioconversión. Varias vitaminas y biofactores relacionados se producen solo o principalmente de forma química (vitamina A, colecalciferol (D_3), tocoferol (E), vitamina K_2 , tiamina (B_1), niacina (PP o B_3), ácido pantoténico (B_5), piridoxina (B_6), biotina (H o B_8), ácido fólico (B_9) o a través de procesos de extracción (β -caroteno o provitamina A, provitamina D_3 , tocoferol, vitamina F-grupo). (Vandamme, 1992)

La presencia de residuos agroindustriales genera impactos negativos y positivos en el ambiente. Todo proceso productivo desarrollado en la agroindustria sin importar la escala, genera residuos agroindustriales a diferentes niveles de acuerdo al proceso que se esté desarrollando. Cuando estos residuos no son debidamente dispuestos y/o no presentan un manejo adecuado, provocan alteraciones de los seres vivos. Sin embargo, si se previene la contaminación de diversos ecosistemas y podrían mejorar las condiciones del ambiente alteradas por las diversas actividades humanas, mejorando la calidad del mismo y evitando afectaciones para la salud humana.

El alto porcentaje de residuos de cacao, hace de éstos un problema ambiental y fitosanitario en las plantaciones de cacao, pero teniendo en cuenta sus niveles nutricionales, estos residuos pueden ser empleados para obtener productos con un alto valor agregado (Ortiz, 2014, pp. 62-68). Entre las opciones para la valorización de la cáscara de cacao, se han abordado diferentes puntos de vista, en los cuales se estudian los contenidos de fibra y la cantidad de polifenoles totales. Los resultados de Flórez y Jerez, muestran que las cáscaras de cacao tienen un contenido de fibra dietaria total de aproximadamente 60% en peso. (Vandamme, 1992, pp. 313-327)

Por otro lado, la fruta de banano contiene 60% de pulpa y 40% de cáscara, es decir que de una caja de banano de 18,14 kg se desperdician 7,25 kg. Desde el punto de vista del consumo final de la planta de banano, solamente se aprovecha el fruto. Cerca del 95% de los residuos que se generan del plátano no son aprovechados eficientemente, la enfoca en la comercialización o como opción alimenticia, por lo que después de usar el fruto destina lo restante a abono, estos residuos impactan al generar el crecimiento de diversos microorganismos que pueden afectar otros cultivos, obstruir cañadas, acumular agua y hongos en lugares inadecuados. (Carrión, s/f, p-3)

Así, la industria platanera produce una gran cantidad de residuos vegetales como pseudotallo, hojas y pinzote o raquis (parte de la planta que sostiene los manojos de frutos). Los ingresos de los productores de cacao y guineo es identificar y comercializar nuevos productos que no interfieran con la cosecha de la semilla. Estos productos provendrían de la pulpa, la cáscara y productos colaterales del proceso industrial del chocolate (concha de cacao, pastel de cacao, y polvo de cacao). Y en el caso del banano que no interfieran con la pulpa, estas porciones no utilizadas contienen muchos potenciales nuevos productos. Los más promisorios de estos productos parecen ser la pulpa de la semilla y la goma de la cáscara, aunque la pulpa es ahora, esencialmente un producto de desecho. En función a lo anteriormente expuesto, el cacao y el guineo se encuentran una amplia gama de componentes bioactivos, los cuales, no han sido estudiados ni analizados en profundidad, desconociéndose su real potencialidad. Esto hace del cacao y guineo ecuatorianos, un área muy interesante de investigación y abre un amplio horizonte de estudio con proyecciones de ensanchamiento industrial hacia las ramas de biotecnología.

1.1 Cacao (*Theobroma cacao* L.)

Theobroma cacao L. conocido comúnmente como cacao, es de las plantas más relevantes para la producción en el mundo. El fruto de esta planta contiene las semillas que son usadas para la elaboración de la manteca de cacao y en especial el chocolate. Estas semillas requieren un proceso antes de obtener sus subproductos, es decir son extraídas de la vaina, fermentadas, secadas, tostadas y molidas para dar el polvo que nos lleva a la obtención de la grasa. Con este cacao se obtiene y se realiza la bebida famosa de chocolate. En la preparación de barras de chocolate, este polvo es mezclado con azúcar, sabores artificiales, y grasa extra de cacao. Las semillas de cacao son la mayor cosecha económica del mundo tropical, pero, solamente cerca del 10% por peso fresco de la fruta es comercializado, aunque varios productos comerciales promisorios pueden ser obtenidos de este fruto. (Kalvatchev, 1998, p. 23)

1.2 Morfología del cacao

Es un árbol o arbusto semicaducifolio que crece de doce a veinte metros de altura, y en cultivo se mantienen normalmente de cuatro a ocho metros. El tallo es parcialmente pubescente en ejes jóvenes. La corteza es oscura, gris-café. Las ramas son cafés y finamente vellosas. Las hojas son o cartáceas simples, enteras o ligeramente sinuadas, angostamente ovadas a obovado-elípticas, ligeramente asimétricas, 17-48(-60) cm de largo y 7-10(-14) cm de ancho. Las flores son pentámeras, hermafroditas, actinomorfas, y (5-) 10-20 mm de diámetro; el pedúnculo floral es de 1-3 cm de largo. Los sépalos son (verdosos) blancos o rosa claros, 5-8 mm de largo, 1.5-2 mm de ancho, angostamente lanceolados, persistentes y fusionados en la base. El fruto es una baya grande (mazorca), polimorfa, esférico a fusiforme, púrpura o amarillo en la madurez, glabro, 10—20(—35) cm de largo y 7 cm ancho, 200—1000 gr de peso y con 5—10 surcos longitudinales. El endocarpo es de 4—8 mm de grosor, duro y carnosos, y leñoso en estado seco. Las semillas son café-rojizas, ovadas, ligeramente comprimidas (Nicolas Dostert, 2012, p. 3)

1.3 Cáscaras de cacao

La cáscara de cacao posee características físicas y químicas que se muestran en la Tabla 1-1, pueden variar dependiendo muchos factores.

Tabla 1-1: Composición Química de la Cáscara de Cacao

Componente	%p/p
Humedad	85
Proteína	1,07
Minerales	1-41
Grasa	0,02
Fibra	5,45
Carbohidratos	7,05
N	0,171
P	0,026
K	0,545
Pectinas	0,89

Fuente: (Kely Lorena Ortiz Valbuena, 2015, p. 68)

Realizado por: Moreira Diana, 2019

1.4 Variabilidad del cacao

La especie se origina en el norte del territorio amazónico, incluyendo Perú, pero fue domesticada primero en Mesoamérica. Para la identificación de las formas y cultivares se utilizan hoy en día, aparte de características morfológicas, y moleculares (isoenzimas), así como también, frecuentemente, marcadores genéticos. Los programas de mejoramiento están, hasta hoy, dirigidos a un aumento de los rendimientos y a una mayor resistencia a plagas; principalmente, se han aprovechado efectos de heterosis después del cruce de individuos de diferentes linajes genéticos (Nicolas Dostert, 2012, p. 4).

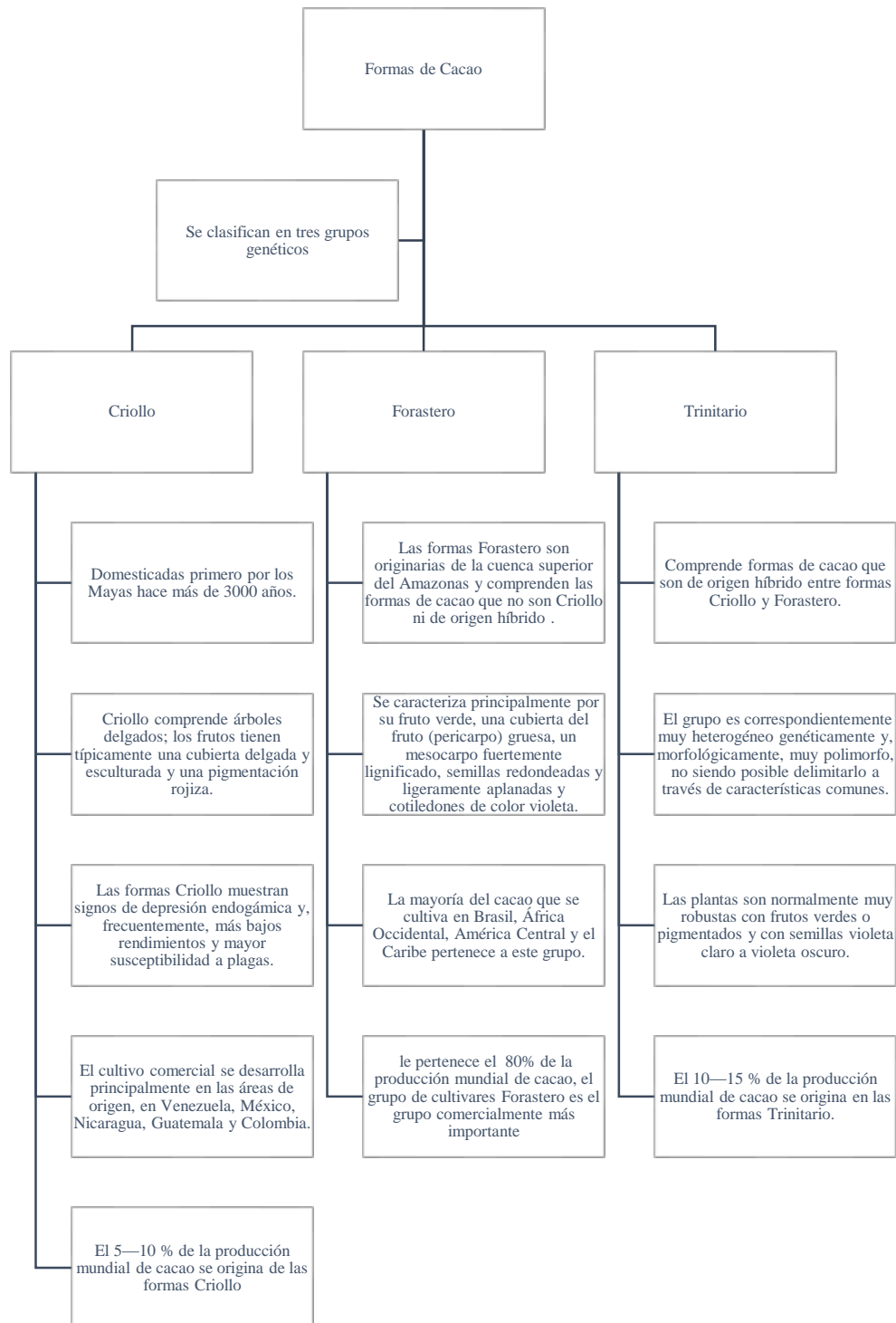


Figura 1-1: Clasificación de formas del Cacao

Fuente: (Nicolas Dostert, 2012)

Realizado por: Moreira Diana, 2019

1.5 Usos del Cacao

El uso de las semillas del cacao puede tener varios usos de acuerdo a las necesidades de la población y se describen en la Figura 2-1.

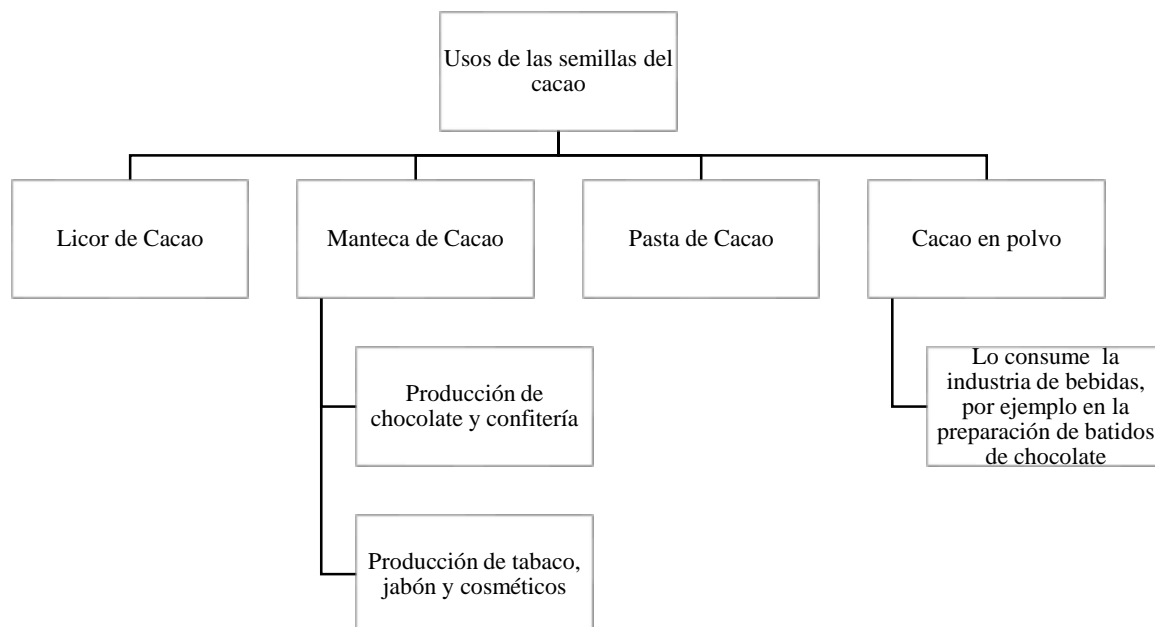


Figura 2-1: Clasificación de los usos del cacao

Fuente: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2019)

Realizado por: Moreira Diana, 2019

1.6 Producción del cacao

El cacao es uno de los principales productos tradicionales de exportación ecuatoriana. Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), el sector cacaotero contribuye con el 5% de la población económicamente activa nacional (PEA) y el 15% de la PEA rural, constituyendo una base fundamental de la economía familiar costera del país, las estribaciones de las montañas de los Andes y la Amazonía ecuatoriana. (ANECACAO, 2019, p. 2)

El cultivo de cacao en Ecuador está en el Litoral y en la Amazonía. La producción de cacao se concentra principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos. En el país se cultivan dos tipos de cacao: el Cacao CCN-51 y el denominado Cacao Nacional. Es un Cacao Fino de Aroma conocido como 'Arriba', desde la época colonial. Ecuador es el país con la mayor participación en este segmento del mercado mundial. Ecuador ha recibido el premio como "mejor cacao por su calidad oral" y "mejor grano de cacao por región geográfica" en el Salón du Chocolat en París, Francia (Guerrero, 2013, p. 1)

Tabla 2-1: Exportaciones totales del Ecuador de los últimos cinco años

EXPORTACIONES DE CACAO / EN TONELADAS MÉTRICAS					
Meses	2014	2015	2016	2017	2018
Enero	14.573	25.582	22.585	26.416	20.573
Febrero	16.737	25.035	23.165	22.398	15.488
Marzo	17.878	26.155	19.396	27.986	20.990
Abril	19.474	16.454	13.164	18.879	20.449
Mayo	16.851	15.169	13.305	16.955	17.720
Junio	14.829	15.749	16.782	16.056	18.785
Julio	16.247	15.065	12.445	20.384	18.645
Agosto	15.800	19.405	13.228	28.622	25.212
Septiembre	20.350	20.903	17.731	29.084	32.091
Octubre	19.873	23.380	28.972	37.316	48.102
Noviembre	25.824	26.276	36.381	33.848	41.820
Diciembre	35.842	31.368	32.478	23.582	35.695
TOTAL	234.277	260.540	249.632	301.526	315.571
VARIACIÓN %	11%		-4%	21%	5%
	2014 - 2015		2015 - 2016	2016 - 2017	2017 - 2018

Fuente: ANECACAO 2019

Realizado por: ANECACAO, 2019

1.7 Residuos Agroindustriales del Cacao

Del fruto del cacao, se aprovechan sólo las semillas que equivalen al 30% del fruto (Nataly Botero R., 2016, p. 622), siendo el principal desecho en la producción de cacao. Los residuos de cacao representan un grave problema, ya que al ser usado como abono sin compostar, se convierten en una fuente significativa de enfermedades causada por varias especies del género como la mazorca negra. Las cáscaras de cacao se han intentado utilizar para la alimentación de animales, su uso no ha sido lo más óptimo, ya que los altos contenidos de alcaloides que restringen el consumo en animales, debido a que sus aparatos digestivos se ven limitados para metabolizar dichos compuestos (Luz Marina Baena, 2012, p. 19).

1.8 Guineo (*Musa paradisiaca*)

El guineo llamado también; banano, banana, plátano y maduro (norte de América del sur, América Central y El Caribe); cambur (Polinesia África y Asia) (Villavicencio, 2016). Es una planta herbácea monocotiledónea, de la familia Musaceae, originaria del sudeste asiático y traída al sur de América por los españoles en el siglo XVI. Es calificado como el cuarto cultivo más importante del mundo, por tratarse de un producto básico y de exportación, fuente de empleo e ingresos en numerosos países del trópico y subtrópico. Las variedades de plátano cultivadas son: dominico-hartón, dominico, hartón, pelipita, morado, cachaco, popocho, pompo, maqueño, guineo y trucho. Este es un producto muy importante en la canasta de los alimentos que se consume en América

del Sur; en el consumo de los alimentos está ubicado en el grupo de los tubérculos, raíces y plátanos, donde tiene un peso del 33% (SIPSA, 2014, p. 3).

1.8.1 Taxonomía del guineo

Es una planta herbácea, que pertenece al grupo de las musáceas. Las raíces son gruesas, carnosas y se ramifican en pelos absorbentes, que son los responsables de la absorción del agua y los nutrientes. Por otro lado, las raíces están situadas en los primeros 30 cm de profundidad. El verdadero tallo de la platanera es un órgano subterráneo que se le conoce como cabeza, cepa o cormo (Cabildo Lanzarote, 2012, p. 2)

Las hojas están dispuestas de forma helicoidal. Los agregados de vainas constituyen el pseudotallo o tronco. Las hojas nuevas cuando aparecen, se encuentran enrolladas y se le conoce como “cigarro”. El eje floral o raquis asciende por el interior del pseudotallo en posición vertical y terminando en un racimo que emerge por la parte superior, lo que se conoce como parición. En el raquis se encuentran las brácteas que protegen las flores y son de color rojo púrpura. Así, las brácteas que cubren las manos masculinas se mantienen unidas al eje del racimo, formando lo que se conoce como bellota. Las flores son hermafroditas, aunque las vainas expuestas, tienen dominancia hembra y son los que darán lugar a los plátanos. Los frutos se despliegan, sin necesidad de polinización. El fruto es una baya alargada y algo encorvada. (Cabildo, 2012, p.3)

1.8.2 Cáscara de Guineo

La cáscara de plátano es rica en fibra dietética, proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos poliinsaturados y potasio; entre los esfuerzos para utilizar la cáscara se han obtenido proteínas, metanol, etanol, pectinas y enzimas, además se considera que la cáscara de plátano puede ser una fuente potencial de sustancias antioxidantes y antimicrobianas, así como compuestos fitoquímicos con actividad contra radicales libres. (Blasco, 2014, p.24)

Tabla 3-1: Composición química de la cáscara de banano

Componentes	Cáscara de Banano Verde	Cáscara de Banano Maduro
% Humedad	91,62	95,66
% Proteína Cruda	5,19	4,77
% Fibra Cruda	11,58	11,95
Energía bruta, Kcal	4383	4592
% Calcio	0,37	0,36
% Fósforo	0,28	0,23
% Ceniza	16,30	14,58

Fuente: (Tartrakoon, et al., 1999, p. 2)

Realizado por: Moreira Diana, 2019

1.8.3 Usos del guineo

El plátano es un producto muy importante para consumo humano local regional y nacional. El racimo es cosechado y desmanado para embalar en canastillas plásticas para su transporte (Villavicencio, 2016, p. 4). Este fruto es lo único consumido por el ser humano y característicamente la pulpa, lo cual produce altas cantidades de desperdicios orgánicos provenientes de las partes de la platanera que no son utilizadas, lo que contribuye a generar problemas ambientales y microbiológicos debidos a la cantidad de humedad y nutrientes presentes en las mismas (Blasco, 2014, p.24)

1.8.4 Residuos del guineo

El principal subproducto del proceso industrial del plátano, es la cáscara la cual representa aproximadamente el 30% del peso del fruto; las aplicaciones potenciales para la cáscara de plátano dependen de su composición química. Entre los usos se ha obtenido carbón vegetal, una fuente de combustible alternativa para cocinar. (Blasco, 2014, p.24).

Una porción muy pequeña de la producción total de bananas se somete a procesamiento industrial, en las cuales mencionamos harinas, salsas y bebidas. El fruto verde se cocina como vegetales, papas fritas, bocadillos, polvo, etc., mientras que el plátano maduro se come crudo (Solan, 2018, p.574)

1.9 Métodos de caracterización

1.9.1 *Determinación de la humedad*

Los métodos de secado son los más comunes para valorar el contenido de humedad en los alimentos; se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas. (ETSIAMN, 2011, p.3)

1.9.2 *Determinación de las cenizas*

La determinación de cenizas es referida como el análisis de residuos inorgánicos que quedan después de la ignición u oxidación completa de la materia orgánica de un alimento. Tres principales tipos de determinación de cenizas existen: 1) Calcinación por secado el cuál funciona para la mayoría de los alimentos. 2) Calcinación por vía húmeda u oxidación húmeda, es para muestras con alto contenido de grasas (carne y productos cárnicos), como una preparación para el análisis mineral y 3) Calcinación de plasma a baja temperatura, también llamado calcinación a bajas temperaturas, funciona para muestras que contienen elementos volátiles. (González, 2015, p.18)

1.9.3 *Determinación de proteínas: Método kjeldahl*

En esta técnica se digieren las proteínas y otros componentes orgánicos de los alimentos en una mezcla con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. Durante el proceso de digestión ocurre la deshidratación y carbonización de la materia orgánica combinada con la oxidación de carbono a dióxido de carbono. El nitrógeno orgánico transformado en amoníaco, se retiene en la disolución como sulfato de amonio. La mezcla digerida se neutraliza con una base y se destila posteriormente. El destilado se recoge en una solución de ácido bórico. Los aniones del borato así formados, se titulan con HCl (o H₂SO₄) estandarizado para determinar el contenido de nitrógeno del alimento (González, 2015, p.24)

1.9.4 *Determinación de grasas*

La cuantificación del contenido de grasa cruda es otra de las determinaciones que integran el análisis próximo de un sistema biológico. Equivale al peso del residuo que se obtiene luego de exponer una muestra previamente deshidratada (materia seca), del sistema biológico a objeto de estudio, a un reflujo con un solvente orgánico no polar por un periodo de tiempo determinado.

1.9.5 Método Soxhlet

La determinación de extracto etéreo es una extracción semicontinua con disolvente donde una cantidad de disolvente rodea la muestra y se calienta a ebullición; una vez que dentro del Soxhlet, el líquido condensado llega a cierto nivel es sifoneado de regreso al matraz de ebullición, la grasa se mide por pérdida de peso de la muestra o por la cantidad de muestra removida (González, 2015, p.22)

1.10 Fermentación

Una fermentación se define como un proceso mediante el cual las sustancias orgánicas, denominados como sustrato, sufren una serie de cambios químicos (reducciones y oxidaciones) que producen energía: al finalizar la fermentación, se presenta una acumulación de varios productos, unos más oxidados y otros más reducidos que el sustrato, con un balance total de energía positivo. Esta energía es utilizada en el metabolismo de los microorganismos (Hernández, 2003, p. 37). La fermentación típica es llevada a cabo por las levaduras. También algunos metazoos y protistas son capaces de realizarla. (Neira, 2012, p. 18)

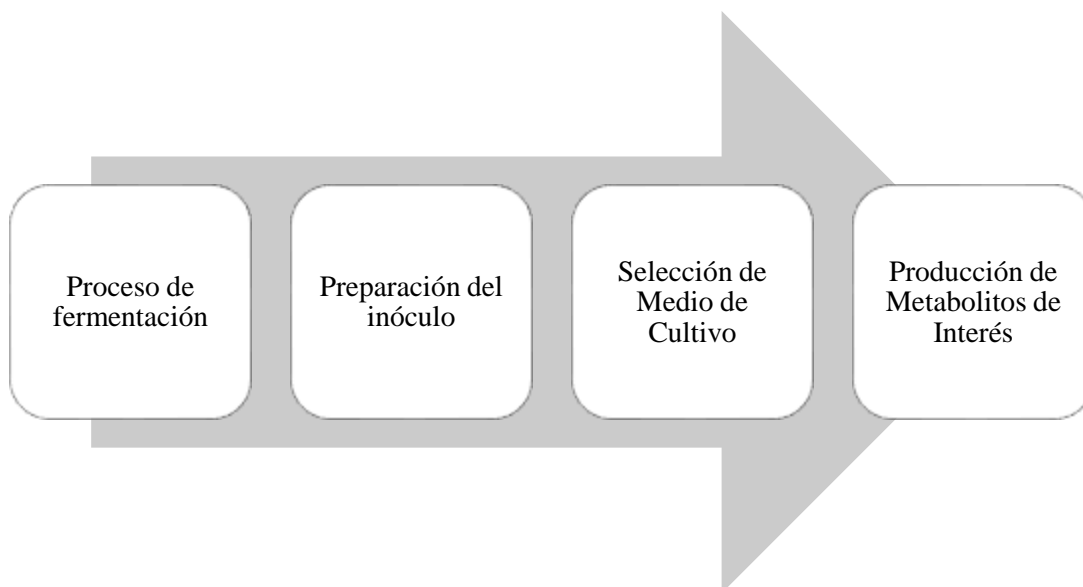


Figura 3-1: Proceso de fermentación

Fuente: (Hernández, 2003, p. 37)

Realizado por: Moreira Diana, 2019

1.10.1 Fermentación aerobia

La digestión aeróbica consiste en procesos realizados por diversos grupos de microorganismos, que, en presencia de oxígeno actúan sobre la materia orgánica disuelta, transformándola en productos finales inocuos y materia celular. La digestión aeróbica es un proceso mediante el cual los lodos son sometidos a una aireación prolongada en un

tanque separado y descubierto. El proceso involucra la oxidación directa de la materia orgánica biodegradable y la auto oxidación de la materia celular. En las primeras fases del proceso de digestión aeróbica, cuando una población de microorganismos se pone en contacto con una fuente ilimitada de sustrato, los microorganismos se reproducen con una tasa de crecimiento poblacional logarítmico que sólo está limitada por su propia habilidad de reproducirse. La tasa de consumo de oxígeno aumenta rápidamente debido a la absorción y asimilación de materia orgánica para la síntesis de nueva masa protoplasmática (Moreno, 2011, p. 13).

1.11. Biorreactores

Los Biorreactores son los equipos donde se realiza el proceso de cultivo (también comúnmente denominado “fermentador”), sea en estado sólido o líquido. Su diseño debe ser tal que asegure homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado. Es importante tomar en cuenta los problemas de transferencia de calor y oxígeno sobre la cama de sustrato, los cuales dependen de las características de la matriz para la fermentación, siendo éste, uno de los principales factores que afectan el diseño y las estrategias de control (Ruíz-Leza, et al., 2007, p. 34).

Los criterios para la construcción de un biorreactor son los siguientes:

- El tanque debe diseñarse para que funcione asépticamente durante numerosos días, para evitar la aparición de contaminantes en las operaciones de bioprocesos de larga duración.
- Debe permitir una mayor área de contacto entre las fases biótica y abiótica del sistema, es decir, se debe proporcionar un sistema adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.
- El consumo de energía debe de ser el mínimo posible.
- Entradas para la adición de nutrientes y el control de pH.
- El crecimiento microbiano es generalmente exotérmico, por lo que, el biorreactor debe facilitar la transferencia de calor, del medio hacia las células y viceversa, a medida que se produce el crecimiento celular, además de mantener estable la temperatura deseada.
- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo.
- Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo.
- El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente inoculado con el microorganismo deseado.

1.11.1 Biorreactor batch

El más tradicional y más usado es el reactor discontinuo. Se emplea usualmente en la industria farmacéutica, alimentaria y biotecnológica. Al ser el tiempo de operación corto en relación con el continuo, se puede obtener condiciones asépticas durante todo el proceso de reacción. En un reactor biológico discontinuo el caldo de nutrientes y la cepa se introducen conjuntamente en el instante inicial. A partir de ese momento no existen corrientes de entrada ni salida del reactor. Sólo habrá entrada y salida de gases (oxígeno, dióxido de carbono) y se adicionará antiespumantes y reguladores del pH (Manzorro, 2007, p. 66).

1.11.2 Nutrientes en Biorreactores

Los nutrientes. Son las sustancias químicas requeridas por las células vivas para realizar el metabolismo de biosíntesis llamado anabolismo y el catabolismo o degradación, del cual se obtiene la energía necesaria para el crecimiento y funcionamiento de los organismos. La molécula de ATP (trifosfato de adenosina) es la molécula de energía de las células y está conformada por un nucleótido¹ de tres fosfatos, del cual se producen por hidrólisis y rompimiento de sus enlaces el ADP (difosfato de adenosina), un grupo fosfato y la energía. Las plantas, las algas y algunas bacterias, mediante la fotosíntesis, transforman la energía del sol en ATP, pero los hongos y la mayoría de animales y microorganismos obtienen la energía al consumir plantas y otros animales, vivos o en descomposición, los cuales están formados de sustancias orgánicas e inorgánicas (Quintero, 2010, p. 2).

1.11.3 Microorganismos en Biorreactores

Los microorganismos. Comprenden las bacterias, los hongos, las levaduras, los virus y algunas algas, y como su nombre lo indica son seres microscópicos, con diferentes formas y requerimientos para su crecimiento. Las bacterias, hongos y levaduras descomponen diversos compuestos y contribuyen al equilibrio ambiental; algunos son patógenos, otros deterioran los alimentos, muchos son beneficiosos para la salud y varios son aprovechados en diferentes industrias. Los microbios requieren para su desarrollo de agua, proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales, y condiciones ambientales y propiedades específicas, como temperatura, actividad del agua, pH, potencial de óxido-reducción y presencia o ausencia de oxígeno (Quintero, 2010, p. 4).

1.12 Ciclo del crecimiento de microorganismos

El crecimiento microbiano está normalmente limitado por el agotamiento de nutrientes o por la acumulación de productos del mismo metabolismo microbiano, que les son tóxicos a la población. La consecuencia es que el crecimiento al cabo de un cierto tiempo llega a disminuir hasta detenerse. Es posible distinguir cuatro fases: 1) fase de latencia o de retardo, 2) fase exponencial, 3) fase estacionaria, 4) fase de muerte (Silvia Benintende, 2002, p. 3).

En la fase de latencia existe una pausa aparente en el que las células realizan su metabolismo. Cuando se hacen mediciones del número de células en distintos tiempos dentro de esta fase, el valor no cambia en gran medida. En cambio, interiormente las células trabajan activamente adaptando el equipo enzimático al medio de cultivo. Pasado este período, el cultivo entra en la denominada fase de crecimiento exponencial, donde la velocidad de crecimiento es máxima. La velocidad de crecimiento que alcanza un cultivo, depende del tipo de microorganismo que se trate y diversos factores ambientales como son la temperatura, el pH, oxigenación, etc. (Brock, 1993, p. 23).

La velocidad de crecimiento comenzará a disminuir hasta hacerse nula cuando alcance la fase estacionaria, ya que cambios en la composición y concentración de nutrientes entre el cultivo del inóculo y el medio fresco pueden desencadenar el control y la regulación de la actividad enzimática. Esta fase se presenta por que se acaba la concentración de algún nutriente esencial o por acumulación de productos que sean tóxicos para el microorganismo (Brock, 1993, p. 23). En esta fase se equilibran el número de células nuevas con el número de células que mueren. Por último, el cultivo entra en la fase de muerte, en la que el número de células que mueren se va haciendo mayor (Silvia Benintende, 2002, p. 3).

1.13 Levaduras

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de organismos unicelulares, incluyendo especies patógenas para plantas y animales, así como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad. Las levaduras han sido utilizadas, desde la antigüedad, en la elaboración de cervezas, pan y vino, pero los fundamentos científicos de su cultivo y uso en grandes cantidades fueron descubiertos por el microbiólogo francés Louis Pasteur en el siglo XIX. (Suarez, 2016, p.21)

1.13.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Es el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad; su nombre deriva del vocablo Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza). Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa. Puede aislarse con facilidad en plantas y tierra, así como del tracto gastrointestinal y genital humano. Esta levadura es una de las especies considerada como microorganismo GRAS, por lo que ha sido aprobada para su uso como aditivo alimentario. (Suarez, 2016, p.21)

Esta levadura es unicelular y eucariota, de forma globular, verde amarillento. Es quimio-organótrofo, ya que requiere de compuestos orgánicos como fuente de energía y no requiere de luz solar para crecer. Esta levadura es capaz de utilizar diferentes azúcares, siendo la glucosa la fuente de carbono preferida. *S. cerevisiae* es anaerobio facultativo, ya que es capaz de crecer en condiciones de deficiencia de oxígeno. Durante esta condición ambiental, la glucosa es convertida en diferentes intermediarios como etanol, CO₂ y glicerol (Martín, 2018, p. 1).

1.13.2 *Condiciones de crecimiento de Saccharomyces cerevisiae*

La temperatura óptima de crecimiento para *Saccharomyces cerevisiae* está en torno a los 25 °C, mientras que temperaturas de 10 a 13 °C son totalmente restrictivas para este microorganismo, aumentando el riesgo de paradas de fermentación o fermentaciones muy lentas (Bujan, 2003, p. 1).

1.13.3 *Uso de Saccharomyces cerevisiae*

El uso más extendido está enmarcado en la panificación y en las industrias de fabricación de cerveza, vinos y alcohol. La levadura inactivada por temperatura se usa como fuente de nutrimentos en alimentación animal y humana, tanto en forma de levadura íntegra como a partir de sus derivados (Suarez, 2016)

1.14 Vitaminas

Las vitaminas son sustancias orgánicas, biológicamente activas, muy simples, necesarias para la vida. En términos generales para decir que una sustancia es una vitamina implica que le sea necesaria al organismo para su normal funcionamiento y completa salud (Ilera, 2000, p.3). Actúan en dosis muy pequeñas. Como nuestro cuerpo no puede fabricarlas por sí mismo, lo nutritivo de

los alimentos no se podría aprovechar ya que activan la oxidación de la comida, las operaciones metabólicas y facilitan la utilización y liberación de energía proporcionada a través de los alimentos (Chazi, 2006, p. 51).

1.15 Vitaminas del Complejo B

Las vitaminas del complejo son las siguientes:

- Vitamina B1 (tiamina)
- Vitamina B2 (riboflavina)
- Vitamina B3 (niacina)
- Vitamina B5 (ácido pantoténico)
- Vitamina B6 (piridoxina)
- Vitamina B7 (biotina), conocida también como vitamina H.
- Vitamina B9 (ácido fólico)
- Vitamina B12 (cobalamina)

1.16 Riboflavina

La riboflavina (vitamina B₂), es un componente de color amarillo, fluorescente, soluble en agua, inalterable con sustancias ácidas y sensible a la luz (Behrman, 2004, p. 182). Fue aislada en 1932 y se detalló tiempo después (Hans Konrad Biesalski, 2007, p. 172), es un componente vital que sostiene el desempeño del metabolismo energético, actuando como cofactor en las reacciones enzimáticas, principalmente en el sistema de transporte de electrones. Esta vitamina está presente en los tejidos de los mamíferos bajo las formas de las coenzimas, realizando las actividades de las flavo proteínas que intervienen en el metabolismo de las proteínas, carbohidratos y grasas (Juana Delgadillo, 2009, p. 19). La riboflavina puede ser sintetizada por muchas bacterias.

Se ha demostrado que la falta de riboflavina en causa alteraciones en la piel y rigidez en la comisura labial, estomatitis angular, lesiones oculares, queilosis, como también anemia y disfunción cerebral (Juana Delgadillo, 2009, p. 172).

1.16.1 Obtención de riboflavina

Tanto la síntesis química como la fermentación sirven para la producción comercial de riboflavina (vitamina B₂). La fermentación es particularmente competitiva cuando se limita a producir concentrados destinados a la alimentación animal (Olmedo, 2018, p. 18).

1.16.1.1 Obtención química de riboflavina

Se han descrito varias rutas químicas de obtención de riboflavina. Estos utilizan protocolos modernos de hidrogenación de flujo que permiten la reducción quimioselectiva de bloques de construcción que contienen grupos nitro para generar rápidamente los intermediarios de amina deseados in situ. Con el fin de explotar los beneficios del procesamiento continuo (Marcus Baumann, 2014, p. 9736).

1.16.1.2 Obtención biotecnológica de riboflavina

Entre las décadas de 1960 y 1990, la producción industrial química intentó minimizar el impacto adverso generado por este proceso mediante el tratamiento de efluentes y la eliminación de contaminantes de un ambiente ya dañado. El diseño de procesos y tecnologías industriales que evitaran la contaminación no se convirtió en una prioridad hasta hace poco. Sin embargo, los intentos de obtener riboflavina por fermentación en lugar de utilizar los procesos químicos menos amigables con la naturaleza ya se iniciaron a mediados del siglo pasado. Las primeras fermentaciones comerciales para la producción de riboflavina se basaron en la bacteria anaeróbica *Clostridium acetobutylicum*. (Revuelta, 2016, p.5)

1.16.1.3 Fisiología de Producción de riboflavina

La primera fase se caracteriza por un rápido incremento del micelio, elevada utilización y oxidación de glucosa y disminución de los valores de pH, causada por acumulación de ácido pirúvico y acetona. La glucosa es oxidada incompletamente. El final de esta fase está marcado por el agotamiento de glucosa y la disminución del crecimiento. La segunda fase comienza con la esporulación y se caracteriza por una rápida síntesis de riboflavina enlazada a la célula. Simultáneamente, hay un rápido incremento en la actividad catalasa y se observa la disminución del piruvato y de la acetona. Se alcanza un pH alcalino que puede llegar a 8, lo que indica el comienzo de la producción de riboflavina. La tercera fase se caracteriza por una autólisis del micelio con lo cual se libera la riboflavina al medio. También disminuye la actividad enzimática de la catalasa. (Lara, 2001, p.21)

1.16.1.4 Microorganismos productores de riboflavina

La síntesis de riboflavina por microorganismos puede ser dividida en 3 categorías, según el grado de acumulación de la vitamina. Así, se encuentran: sobreproducciones débiles, moderadas y fuertes; tal como las presentan varias bacterias y algunas levaduras y hongos (Lara, 2001, p.11)

Tabla 4-1: Microorganismos Productores de Riboflavina

Productores Débiles: <i>Bacterias</i>	Productores Moderados: <i>Levaduras</i>	Productores fuertes: <i>Hongos Semejantes a Levaduras</i>
<i>Clostridium acetobutyricum</i>	<i>Candida arborea</i>	<i>Ashbya gossypii</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Candida flareri</i>	<i>Eremothecium ashbyii</i>
<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Cándida guilliermondii</i>	
<i>Azotobacter agile</i>	<i>Saccharomyces sp.</i>	
<i>Aerobacter cloacae</i>	<i>Rhodotorala sp.</i>	

Fuente: Lara, 2001

Realizado por: Moreira Diana, 2019

1.17 Métodos de Identificación de Compuestos

1.17.1 Cromatografía en capa fina

Es una técnica para separar sustancias químicas disueltas en virtud de su migración diferencial sobre placas de vidrio o láminas de plástico recubiertas con una capa delgada de un adsorbente finamente molido, como gel de sílice o alúmina, que se mezcla con un aglutinante como almidón o yeso de París. La técnica, que se ha convertido en una herramienta analítica estándar en laboratorios alimentarios y farmacéuticos, es especialmente útil para separar los componentes de sustancias naturales, en particular las que se encuentran en los tejidos animales y vegetales llamados lípidos y los componentes volátiles y fragantes de plantas y flores conocidas como terpenos (Tikkanen, 2019, p. 1)

1.17.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Cromatografía líquida de alto rendimiento (o cromatografía líquida de alta presión, HPLC) es una forma específica de columna cromatografía generalmente utilizada en bioquímica y análisis para separar, identificar y cuantificar los compuestos activos. HPLC utiliza principalmente una columna que contiene material de embalaje (fase estacionaria), una bomba que mueve la fase móvil a través de la columna, y un detector que muestra los tiempos de retención de las moléculas. El tiempo de retención varía dependiendo de las interacciones entre la fase estacionaria, siendo las moléculas analizado y el solvente utilizado. Ella muestra a analizar se introduce en pequeño volumen a la transmisión de la fase móvil y es retardado por un químico específico o interacciones

físicas con la fase estacionaria. La cantidad de retraso depende sobre la naturaleza del analito y composición de estadísticas y dispositivos de la fase móvil. El momento en que un analito específico eluye (sale del final de la columna) se llama tiempo de retención. Los solventes comunes utilizados incluyen combinaciones miscibles de agua u orgánicas líquidos (los más comunes son metanol y acetonitrilo) (Malviya R, 2010, p. 22).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Tipo y diseño de la investigación

La presente investigación es del tipo cuantitativa, ya que se constata la concentración de riboflavina que se puede identificar de las fermentaciones, según el objetivo se puede calificar como aplicada ya que se obtienen resultados inmediatos y precisos, según el nivel de profundización en el objeto de estudio se considera exploratoria. Según la clasificación de manipulación de variables; es experimental. La categoría de tipo de inferencia es deductiva, ya que se realizó desde la predicción que se pueden reutilizar los residuos agroindustriales para la obtención de riboflavina, según el periodo temporal longitudinal por que se realiza en orden de tiempo.

2.1.1 *Unidad de análisis*

Cada unidad de análisis corresponde a los 15 biorreactores prototipo, de los cuales:

- 5 biorreactores prototipo de residuos de cacao (FC).
- 5 biorreactores prototipo de residuos de guineo (FG)
- 5 biorreactores prototipo de residuos de cacao al 50% y guineo al 50% (FCG).

2.1.2 *Población de estudio*

- Cáscaras de *Theobroma cacao* (cacao criollo tipo CCN-51).
- Cáscaras de *Musa paradisiaca* (guineo).

2.1.3 *Tamaño de la muestra*

Cada muestra corresponde a 500 gramos de residuos agroindustriales de acuerdo al tamaño del reactor prototipo, para que la fermentación sea eficiente.

2.1.4 *Método de muestreo*

Muestreo aleatorio simple.

2.1.5 *Hipótesis y especificación de variables*

La riboflavina puede ser obtenida empleando el proceso de fermentación de residuos agroindustriales de cacao y guineo

2.1.6 *Identificación variables*

Variable Independiente: Residuos de cacao y guineo.

Variable dependiente: Vitamina B₂.

2.1.7 *Obtención de residuos de cacao*

Los residuos de Cacao de esta investigación provienen de un pequeño terreno de plantación de Cacao CCN- 51, ubicada en la provincia Santo Domingo de los Tsáchilas en el cantón Santo Domingo km 7 de la Vía Santo Domingo- Quevedo, Comuna Chigüilpe.

2.1.8 *Obtención de residuos de guineo*

Los residuos de guineo de esta investigación provienen de una plantación de guineo, ubicada en la provincia Santo Domingo de los Tsáchilas en el cantón Santo Domingo km 7 de la Vía Santo Domingo- Quevedo, Comuna Chigüilpe; se los obtiene luego de extraer del fruto la parte comestible.

2.2 Primera Etapa: Caracterización de los residuos agroindustriales de cacao y guineo

2.2.1 *Análisis de cenizas por gravimetría.*

En un crisol previamente tarado y pesado hasta peso constante, se colocan de 3 a 5 gramos de residuos agroindustriales, son puestos en la parrilla (hasta eliminar los vapores) y luego llevados a la mufla a 500 °C hasta su calcinación (Anexo A). Los crisoles son nuevamente pesados y se realiza el cálculo correspondiente.

$$\%Cenizas = \frac{(P - p) * 100}{M}$$

(Ec 1-2)

P: Masa del crisol con las cenizas en gramos.

p: Masa de crisol vacío en gramos.

M: Masa de la muestra en gramos.

2.2.2 *Análisis de Humedad por gravimetría*

En un crisol previamente tarado, controlado hasta peso constante, se colocan de 3 a 5 gramos de residuos agroindustriales, se los pone en la parrilla (hasta que eliminen los vapores), luego en la estufa a 30 °C. Se pesan nuevamente los crisoles y con los datos obtenidos se aplica:

$$\%Humedad = \frac{M1 - M2 * 100}{(M)}$$

(Ec 2-2)

M1: Peso de crisol más muestra húmeda (g.)

M2: Peso de crisol más la muestra de suelo seca (g)

M: Peso de la muestra (g)

2.2.3 *Análisis de proteínas: Método Macrokjeldhal*

- En el tubo de digestión Macrokjeldhal se colocan 0,5 g de muestra de residuos.
- Al tubo con la muestra se añade 2 g de mezcla catalizadora (1,8 de K₂SO₄ o Na₂SO₄ y 0,2 g de CuSO₄), y 20 ml de ácido sulfúrico.
- Se coloca el tubo en el digestor conectado a la bomba de agua, verificando que el equipo esté dispuesto para el uso. Cuando el equipo acaba su proceso, se apaga dejándolo enfriar.
- Se retira el tubo frío del digestor y se agregan 25 ml de agua destilada.
- Se coloca el tubo en la parte del destilador, a la derecha del destilador se instala un Erlenmeyer de 500 ml con 50 ml de ácido bórico al 4% y dos gotas del indicador conformado por rojo de metilo y verde de bromocresol.
- Al finalizar la destilación se observa un color verde esmeralda.
- El destilado se titula con HCl N/10 hasta observar el cambio de color.
- Se calcula el porcentaje de N₂ y de proteína. Fórmula 3-2.

$$\%P = 1,4 \times f \times V \times N/m$$

Donde:

- %P: Contenido de proteína en porcentaje de masa.
- f: Factor para transformar el porcentaje de N₂ en proteína es específico para cada tipo de muestra.
- V: Volumen de HCl usado para titular en ml.
- M: Masa en gramos

2.2.4 *Análisis de grasas: Extracción en Soxhlet*

- Se pesan 2 g de muestra seca de residuos agroindustriales y se los coloca en una bolsa de papel filtro.
- En el balón previamente tarado, se adiciona 250 ml de éter etílico.
- Se arma el equipo Soxhlet y somete a calentamiento sobre reverbero.
- Se conecta los tubos de entrada y salida de agua.
- Se realiza la extracción de la grasa por alrededor de 4 horas.
- Se retira el balón con el solvente más el extracto y se evapora en rota vapor.
- El balón con la grasa extraída se pesa y se realizan los cálculos con la fórmula 4-2:

$$\%G = (ExE) = [(P1 - P)/m] \times 100$$

(Ec: 4-2)

- G: Porcentaje de grasa cruda expresada en masa.
- P1: Masa del vaso más la masa cruda en gramos.
- M: Masa de la muestra seca tomada para la determinación en gramos.

2.2.5 *Análisis simple para determinar presencia de bacterias, hongos y levaduras en los residuos agroindustriales de cacao y guineo.*

Por el método de recuento por siembra en extensión superficial se inocula 100ul de cada residuo agroindustrial a utilizar en cajas en medio de PCA para determinar y cuantificar las Unidades formadoras de colonias (UFC) bacterias y medio Saboraud para levaduras y hongos.

2.3 Segunda Etapa: Ensamblaje de los biorreactores prototipo.

2.3.1 Montaje de los biorreactores prototipo

- Se usan recipientes de plástico de 4 litros con tapa rosca hermética, y se les realizan agujeros para la entrada y salida de aire.
- Se colocan las mangueras para la entrada (2 de 30 cm de largo x 1 cm de diámetro, material de goma) y salida de aire (1 de 80 cm de largo x 1 cm de diámetro, material plástico) y se las sella para que no existan fugas.
- En las mangueras de entrada de aire se les coloca el aireador, de la marca JAD, modelo S-2000.

2.3.1.1 Inicio de la fermentación

- Esterilización de 500 g de residuo agroindustrial por biorreactor, es decir:
 - 5 biorreactores con 500 g de residuo de cacao (FC).
 - 5 biorreactores con 500 g de residuos de guineo (FG).
 - 5 biorreactores con 250 g de residuos de Cacao más 250 g de residuos de guineo (FG).
- Por cada reactor se hizo 500 ml de caldo compuesto por:
 - 14 g de Extracto de Malta.
 - 2,5 g de Agua de Peptona
 - 0,4 g de Cloranfenicol.
- Para la activación de las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*.
 - 37 g de levadura comercial de *Saccharomyces cerevisiae* más 500 ml de solución de glucosa a la concentración 1/100 p/p, a 20°C.
- Todo lo antes mencionado se colocó en el biorreactor prototipo previamente esterilizado a una temperatura no más alta de los 20 °C.
- Inmediatamente luego de que esté todo en el biorreactor, se sella y se encienden los aireadores, colocando los biorreactores en un lugar oscuro y limpio (Anexo B).
-

2.3.1.2 Control de las fases de fermentación.

Desde el inicio de la fermentación, diariamente se extrae 1 ml de muestra de cada reactor diluyendo hasta 10^{-7} , con esta dilución se realiza el recuento de microorganismos, por siembra en extensión superficial con cajas Petri de agar Saboraud, hasta que no haya crecimiento en las placas.

2.4 Tercera Etapa: Control de presencia de riboflavina.

2.4.1 Control por medio de cromatografía en capa fina

- Se toma una muestra de los biorreactores.
- Se activaron placas de TLC- Si-C₁₈ marca BAKER a 200 °C por 1 hora.
- Se aplica el estándar de riboflavina y la muestra de la fermentación correspondientemente.
- Se coloca en la cuba cromatografía de vidrio, el eluyente: metanol, agua, amonio (7:3:1), hasta la saturación de la cuba (Homayon Ahmad Panahi, 2008, p. 68).
- Se introducen en la cuba las placas cromatográficas con estándar y muestra para su elución (Anexo C).
- Mantener el proceso con poca (o nula) luz.
- Cuando el frente del solvente alcanza las tres cuartas partes de la placa retirarlas de la cuba y dejar secar.
- Determinar el Rf del estándar y de la muestra.

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}$$

(Ec: 5-2)

2.4.2 Control por medio de HPLC

- Tipo de detector: Fluorometría
- Tipo de columna: C18 de 4.6*150mm 5um
- Condiciones: longitud de onda, 450 nm excitación, 528 nm emisión
- Tipo de fase: fase reversa
- Fase móvil fosfato de potasio pH 7.2:N,N Dimetilformamida relación 70:30

2.5 Quinta Etapa Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizan Con el programa “R” versión 3.6.1, y se realizan las siguientes pruebas:

- Prueba de Normalidad Shapiro Wilk.
- Prueba de Homogeneidad Test de Levene.
- Análisis de Varianza de ANOVA.
- Comparación de tratamientos por el método Tukey.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Caracterización de los residuos.

3.1.1 *Determinación de cenizas en cacao y guineo*

Tabla 1-3: Determinación de cenizas de residuos de cacao y guineo.

Muestra	Cenizas %
Residuo Cacao#1	2.01
Residuo Cacao#2	2.32
Residuo Cacao#3	2.11
Residuo Guineo#1	1.725
Residuo Guineo#2	1.33
Residuo Guineo#3	1.265

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

Los residuos de Cacao tienen un promedio de 2.15 de ceniza y en los residuos de guineo 1.44 %. Las cenizas representan los minerales que se encuentran en la muestra, y éstos son parte integral de las proteínas como activadores enzimáticos y funcionan como cofactores en reacciones químicas que se dan en las células y también se requieren para su crecimiento (Chávez, 1998, p. 40). Estos valores corresponden a los porcentajes de cenizas de los residuos orgánicos que son menores al 4.9%, que se miden para usos como alimentación de animales. (Ramírez, 2017, p.118),

3.1.2 *Determinación de humedad en cacao y guineo*

Tabla 2-3: Determinación de humedad en residuos de cacao y guineo.

Muestra	Humedad %
Residuo Cacao#1	77.105
Residuo Cacao#2	73.375
Residuo Cacao#3	88.785
Residuo Guineo#1	83.875
Residuo Guineo#2	78.035

Residuo Guineo#3	72.785
------------------	--------

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

La humedad de los residuos de cacao registra a un promedio de 79.8 % y los residuos de guineo un 78.2 %, esto corresponde a la humedad de los residuos orgánicos que se pueden reutilizar.

Según estudios los residuos orgánicos para la alimentación de animales y tienen un porcentaje entre 75-95% de humedad (Viviana Marcela Ramírez, 2017).

3.1.3 Control microbiológico de residuos de cacao y guineo.

Tabla 3-3: Análisis microbiológicos en residuos de cacao y guineo.

Microbiológico	PCA	Saboraud	
		Levadura	Moho
Guineo Sin Esterilizar	362×10^{-3} UFC	+	-
Cacao sin Esterilizar	18×10^{-6} UFC	+	+

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

Estos resultados, ayudan a determinar que, al tener una gran cantidad de microorganismos, para el uso deseado, es decir las fermentaciones, se deben esterilizar para poder utilizarse. Por otro lado, siendo la levadura uno de los microorganismos nativos de estos residuos, comprueba que estas cáscaras son aptas para el crecimiento de las mismas.

3.1.4 Determinación de porcentaje de proteína residuos de cacao y guineo

Tabla 4-3: Porcentaje de proteína en residuos de cacao y guineo

Tipo de Residuo	Titulación Con HCl 10N (mL)	Proteína de la Masa Total %
Residuos Cacao#1	5.1	8.925
Residuos Cacao#2	5.3	9.275
Residuos Cacao#3	5.5	9.625
Residuos de Guineo#1	3.7	6.475
Residuos de Guineo#2	4.4	7.700
Residuos de Guineo#3	3.9	6.825

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

La riboflavina es una vitamina sintetizada muy fácilmente por microorganismos como varias bacterias, algunas levaduras y hongos (Lara, 2001), existiendo productores débiles, moderadas y fuertes; de acuerdo a la información bibliográfica, *Saccharomyces cerevisiae*, es un productor moderado de Riboflavina como se muestra en la tabla 4-1, constituyendo un factor importante para su producción el contenido de proteína, lo que se evidencia con los porcentajes de proteína presentes en el residuo de cacao en relación al guineo, correspondiendo a la concentración de Riboflavina obtenida a partir de cada residuo.

Las levaduras durante el proceso de crecimiento y fermentación metabolizan los componentes del medio de crecimiento, descomponen los azúcares, desaminan y descarboxilan los aminoácidos, proteínas y otros componentes (Chávez, 1998, p. 31), por ello es importante que los residuos de cacao y guineo tengan un alto contenido de proteína, necesaria para su crecimiento y producción de riboflavina; el promedio de las proteínas en los residuos de cacao es de 9.3% y de los residuos de guineo es menor con 7.0% .

3.1.5 Determinación de porcentaje de grasa en cacao y guineo

Tabla 5-3: Porcentaje de grasa en residuos de cacao y guineo.

Tipo de Residuo	Grasa de la Masa Total (g)
Residuos cacao#1	27.105
Residuos cacao#2	26.06
Residuos cacao#3	23.48
Residuos de Guineo#1	34.135
Residuos de Guineo#2	36.695
Residuos de Guineo#3	32.89

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

El contenido de grasa, en el residuo de cacao (aproximadamente 25.548%) es notablemente menor que en el residuo de guineo, aproximadamente (34.57%); la grasa en los residuos es una de las principales fuentes de carbono para el desarrollo de las levaduras, se evidencia un mayor crecimiento de éstas aun cuando se añaden bajas concentraciones de aceites; en cuanto a la influencia del contenido de grasa residual en la producción de riboflavina, estudios realizados por *Ashbya gossypii*, (Lara, 2001, p.68) determinan que incluso el aumento de sólo un 2.5% de grasa en

la biomasa mejoró significativamente la producción de riboflavina. En la presente investigación no se ha podido comprobar si existe una relación entre estos dos parámetros.

3.2 Fermentación de Residuos de Cacao y Guineo

3.2.1 Curva de crecimiento de las fermentaciones

3.2.1.1 Fermentación de residuos de cacao, concentración 1×10^{-7}

Tabla 6-3: Crecimiento microbiano en las fermentaciones de residuos de cacao en UFC

Día	FC#1	FC#2	FC#3	FC#4	FC#5
1	17	16	18	17	18
2	192	189	190	185	193
3	73	71	70	68	74
4	58	59	60	56	55
5	58	58	61	57	55
6	57	59	60	58	56
7	44	43	45	44	47
8	40	38	39	41	43
9	31	28	30	30	34
10	57	58	55	57	60
11	27	25	26	28	26
12	28	26	27	30	27
13	34	33	34	33	35
14	51	50	52	49	52
15	12	15	13	16	11
16	4	5	3	4	2
17	0	0	0	0	0

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

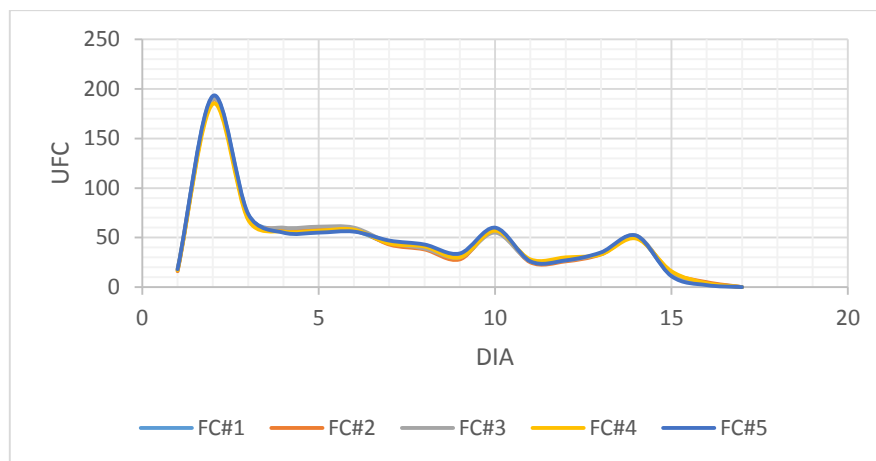


Gráfico 1-3: Curva de crecimiento microbiano en la fermentación de residuos de cacao

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

La curva de crecimiento en la fermentación del cacao se dio en 16 días, se observan las fases de crecimiento microbiano conocidas; en el primer día la fase de latencia, del segundo al tercer día, la fase de crecimiento exponencial y del cuarto al décimo día, la fase estacionaria en donde no se puede ver gran diferencia en el conteo microbiano exceptuando las fluctuaciones debidas a la temperatura, la temperatura óptima de crecimiento de las levaduras es de 5°C y 30 y 37°C , aproximadamente el valor óptimo es de 25°C (Chávez, 1998, p. 38), en Riobamba el lugar de la experimentación la temperatura promedio varía entre 8°C y 19°C (Cedar Lake Ventures, Inc., 2019), consecuentemente el crecimiento de las levaduras varía. En el día 11 se puede ver el inicio de la fase de muerte celular.

3.2.1.2 Fermentación de Residuos de Cacao y Guineo, concentración 1×10^{-7}

Tabla 7-3: Curva de crecimiento microbiano en las fermentaciones de residuos de de cacao y guineo en UFC.

Día	FCG#1	FCG#2	FCG#3	FCG#4	FCG#5
1	16	18	16	17	18
2	30	32	34	29	30
3	54	52	53	54	53
4	50	51	51	50	52
5	134	136	134	132	136
6	150	152	148	151	151
7	123	125	122	124	124
8	140	142	141	145	144
9	126	120	110	118	122
10	80	82	81	83	84
11	79	78	77	79	79
12	82	81	79	82	81

13	62	61	60	63	64
14	45	42	43	46	43
15	30	29	28	31	32
16	11	15	13	14	12
17	5	5	6	4	5
18	5	5	4	5	5
19	2	3	3	4	4
20	1	1	2	2	1
21	1	1	1	1	1
22	0	0	0	0	0

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

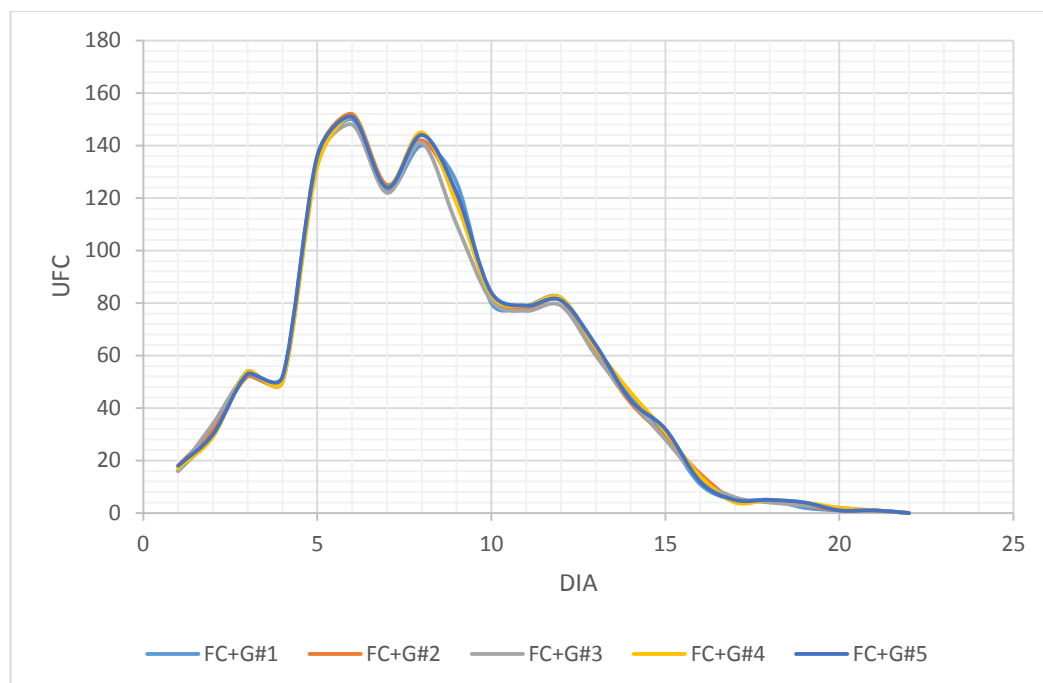


Gráfico 2-3: Curva de crecimiento microbiano en la fermentación de residuos de cacao y guineo.

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

En la curva de crecimiento de fermentación del cacao y guineo se dio en 21 días, se observan las fases de crecimiento ya mencionadas, del día 1 al 4 a la fase de latencia del día 5 al 9 la fase de crecimiento exponencial, y del día 10 al 15 la fase estacionaria en donde no se puede ver gran diferencia en el conteo microbiano exceptuando las fluctuaciones debidas a la temperatura, del día 16 al 21 la fase de muerte celular.

3.2.1.3 Fermentación de residuos de guineo, concentración 1×10^{-7}

Tabla 8-3: Curva de crecimiento microbiano en las fermentaciones de residuos de guineo.

Día	FG#1	FG#2	FG#3	FG#4	FG#5
1	15	16	15	14	16
2	130	125	132	135	128
3	157	152	159	155	154
4	136	134	138	137	135
5	138	135	139	140	137
6	147	145	144	146	144
7	150	152	153	153	149
8	120	123	119	124	120
9	115	117	114	120	117
10	90	94	95	93	91
11	80	83	86	81	83
12	63	62	61	64	62
13	45	46	47	48	50
14	31	28	33	34	32
15	24	22	25	23	20
16	17	18	15	14	16
17	10	9	6	5	7
18	4	5	2	1	3
19	0	0	0	0	0

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

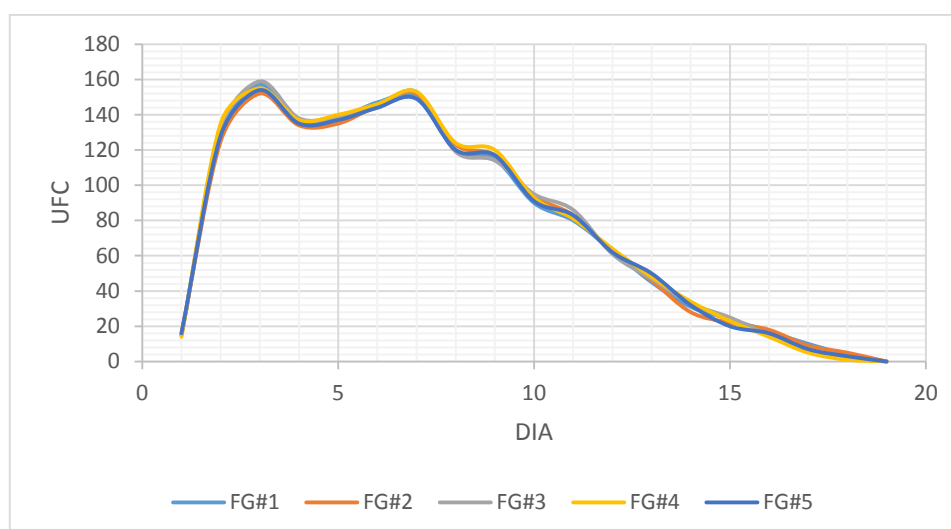


Gráfico 3-3: Curva de crecimiento microbiano en la fermentación de residuos de guineo.

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

En la curva de crecimiento de la fermentación de los residuos de guineo duró 18 días, se observan las fases de crecimiento ya mencionadas, solo el primer día en fase de latencia, del segundo día al sexto en fase de crecimiento exponencial, y del día séptimo al décimo la fase estacionaria en donde no se puede ver gran diferencia en el conteo microbiano exceptuando las fluctuaciones debidas a la temperatura, del día 11 al 18 la fase de muerte celular.

3.3.1 *Análisis por cromatografía en capa fina de las fermentaciones*

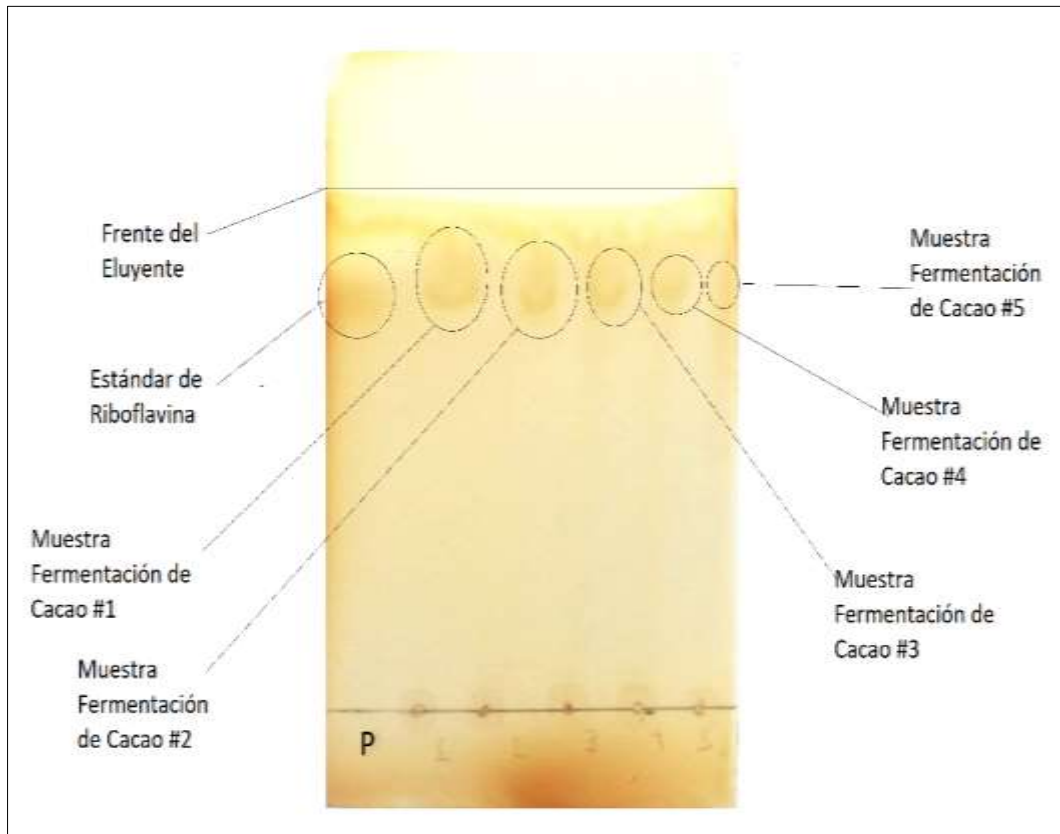


Figura 1-3: Cromatografía en capa fina de la fermentación de cacao, con muestra patrón de riboflavina.

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

Cálculos realizados con la ecuación 5-2:

Tabla 9-3: Cromatografía en capa fina en fermentaciones de residuos de Cacao.

Muestra	Distancia Recorrida por el soluto (cm)	Distancia recorrida por la fase móvil (cm)	Rf	Resultado
Patrón	3.9	4.3	0.91	Riboflavina
Fermentación de Cacao #1	3.95	4.3	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.
Fermentación de Cacao #2	3.9	4.3	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.
Fermentación de Cacao #3	3.9	4.3	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.
Fermentación de Cacao #4	3.9	4.3	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.
Fermentación de Cacao #5	3.9	4.3	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

Tabla 10-3: Cromatografía en capa fina en fermentaciones de residuos de cacao y guineo.

Muestra	Distancia Recorrida por el soluto (cm)	Distancia recorrida por la fase móvil (cm)	Rf	Resultado
Patrón	4.95	5.4	0.91	Riboflavina
Fermentación de Cacao y Guineo #1	4.9	5.4	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.
Fermentación de Cacao y Guineo #2	4.92	5.4	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.

Fermentación de Cacao y Guineo #3	4.91	5.4	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.
Fermentación de Cacao y Guineo #4	4.93	5.4	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.
Fermentación de Cacao y Guineo #5	4.92	5.4	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

Tabla 11-3: Cromatografía en capa fina en fermentaciones de residuos de guineo.

Muestra	Distancia Recorrida por el soluto (cm)	Distancia recorrida por la fase móvil (cm)	Rf	Resultado
Patrón	4.7	5.1	0.91	Riboflavina
Fermentación de Guineo#1	4.8	5.1	0.92	Coincide con el patrón de riboflavina.
Fermentación de Guineo#2	4.7	5.1	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.
Fermentación de Guineo#3	4.7	5.1	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.
Fermentación de Guineo#4	4.8	5.1	0.92	Coincide con el patrón de riboflavina.
Fermentación de Guineo#5	4.7	5.1	0.91	Coincide con el patrón de riboflavina.

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

El cromatograma (Figura 4-3) corresponde al Rf de las muestras de la fermentación .comparado con el patrón o sustancia estándar de riboflavina siendo de 0.91, el valor de Rf depende de las condiciones en las cuales se corre la muestra (tipo de adsorbente, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación, etc.") (Abbott D., 1970, p. 8). Se tomó como referencia al artículo Separation of Vitamin B₂ and B₁₂ by Impregnate HPTLC Plates with

Boric Acid (Homayon Ahmad Panahi, 2008) que indica que con el eluyente metanol, agua, amonio (7:3:1); concuerda con un R_f de 0.91 para la Riboflavina. Verificándose la presencia de esta vitamina en cada una de las muestras de la fermentación analizadas.

En las tablas 13-3, 14-3 y 15-3 correspondientes a la fermentación de: cacao, cacao-guineo y guineo respectivamente; en base a los valores de R_f obtenidos se puede evidenciar la presencia de Riboflavina como producto de dichas fermentaciones, variando la concentración en función del sustrato empleado, lo que se comprueba por medio del análisis cromatográfico por HPLC (Figura 7-3).

3.3.2 HPLC de las fermentaciones de los residuos de cacao y guineo.

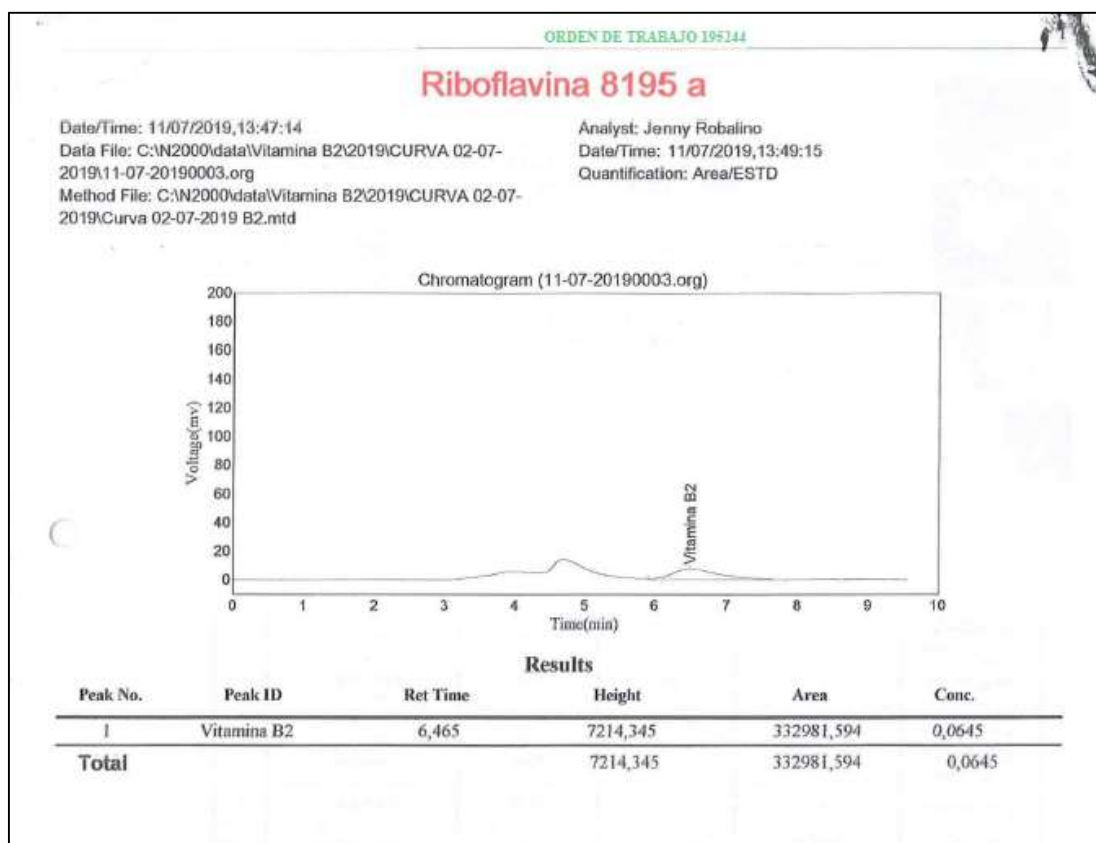


Figura 2-3: Cromatograma de riboflavina (vitamina B₂) de fermentación de residuos de cacao (0.1 mg/100g)

Realizado por: Robalino Jenny, 2019.

Tabla 12-3: Concentración de riboflavina en las fermentaciones de residuos de cacao.

Fermentación Cacao	
Muestra	Riboflavina (mg/100g)
FC#1	0,10
FC#2	0,08
FC#3	0,09
FC#4	0,09
FC#5	0,10

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

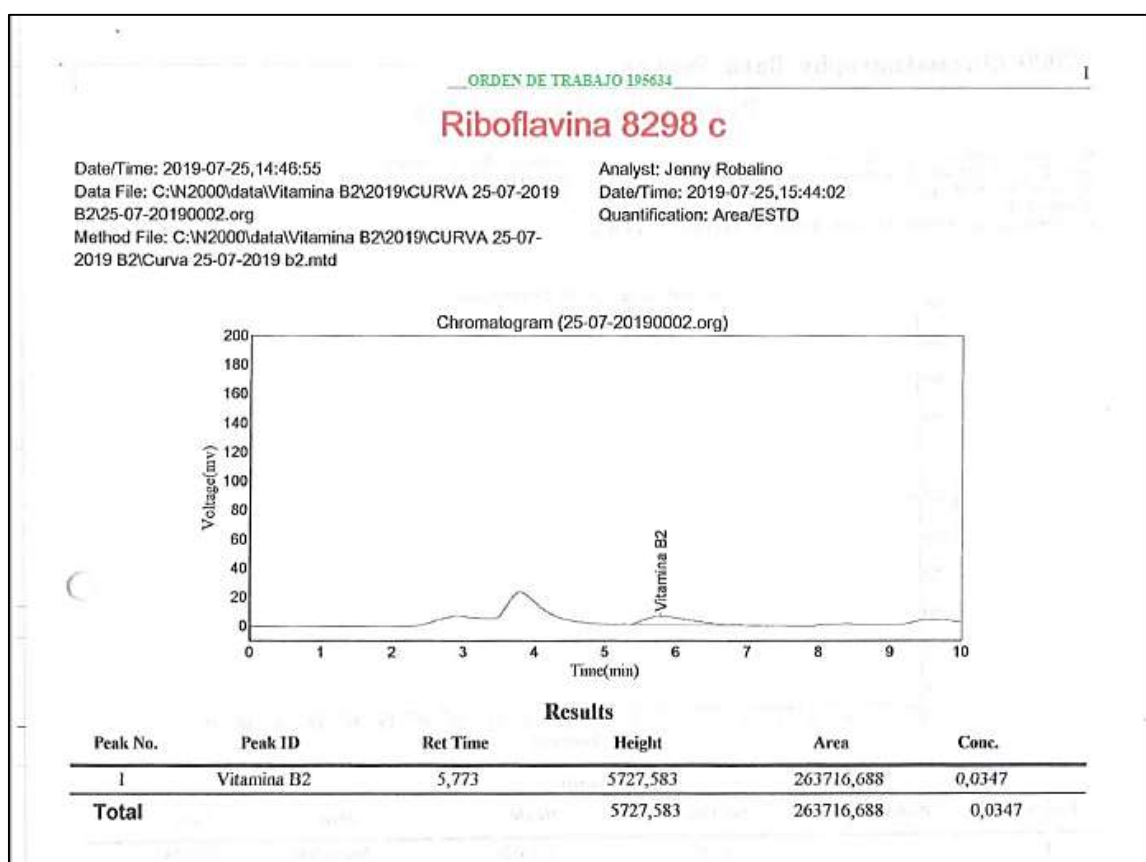


Figura 3-3: Cromatograma de riboflavina (vitamina B₂) de fermentación de residuos de cacao y guineo (0.05 mg/100g)

Realizado por: Jenny Robalino, 2019,

Tabla 13-3: Concentración de riboflavina de las fermentaciones de residuos de cacao y guineo.

Fermentación Cacao + Guineo	
Muestra	Riboflavina (mg/100g)
FCG#1	0,04
FCG#2	0,05
FCG3	0,04
FCG#4	0,06
FCG#5	0,05

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

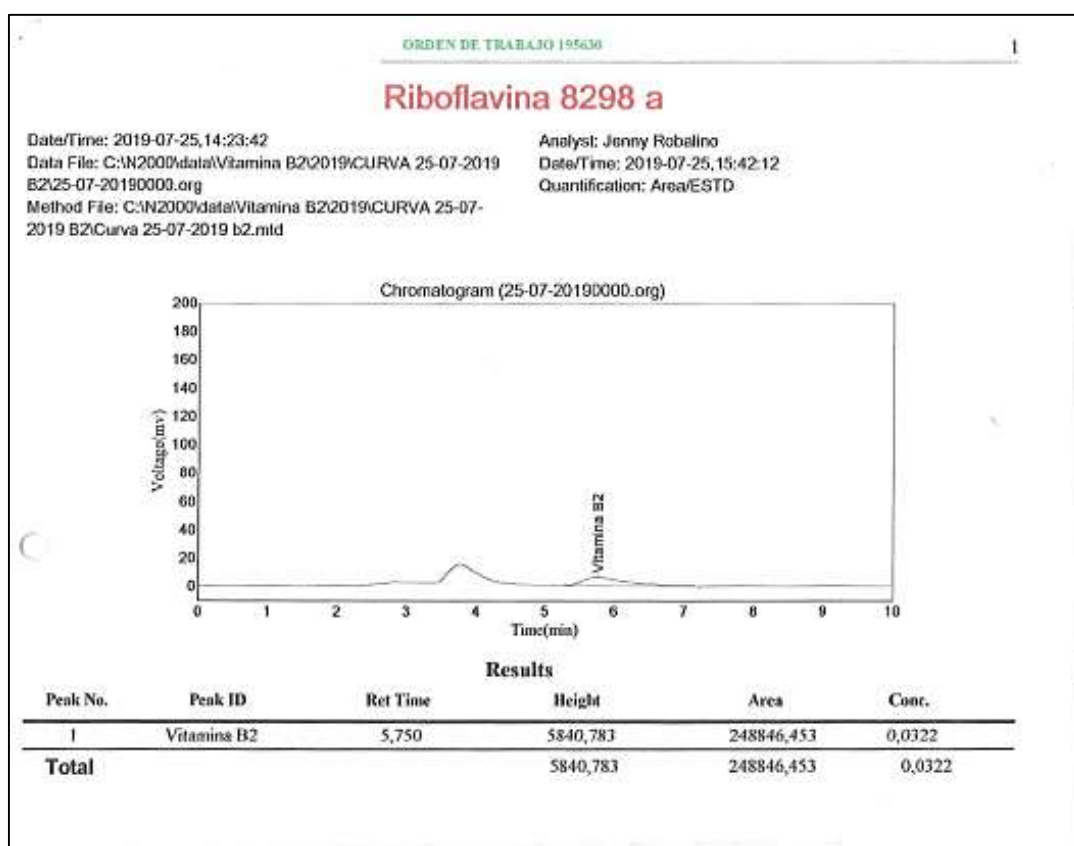


Figura 4-3: Cromatograma de Riboflavina (Vitamina B₂) de Fermentación de residuos de Guineo (0.05 mg/100g)

Realizado por: Robalino Jenny, 2019.

Tabla 14-3: Concentración de riboflavina de las fermentaciones de residuos de guineo.

Fermentación Guineo	
Muestra	Riboflavina (mg/100g)
FG#1	0,05
FG#2	0,08
FG#3	0,06
FG#4	0,07
FG#5	0,08

Realizado por: Moreira Diana (2019)

Al determinar el contenido de proteína en los residuos empleados se observa que el cacao presenta un mayor contenido de proteína que el guineo, lo que influye finalmente, luego del proceso fermentativo, en la producción de vitamina B₂. Observando los cromatogramas por HPLC se observa diferentes concentraciones del producto de fermentación en los tres sustratos: 0,1 mg/100g a partir de cacao, 0,05 mg/100g de cacao-guineo y 0,05 mg/100g de guineo.

3.3 Análisis estadístico

3.3.1 Prueba De Normalidad Shapiro Wilk, para los resultados HPLC de las concentraciones de Riboflavina de las fermentaciones.

3.3.1.1. Planteamiento de hipótesis.

- Ho: Las concentraciones de riboflavina de los fermentadores se distribuyen normalmente.
- Ha: Las concentraciones de riboflavina de los fermentadores no se distribuyen normalmente.

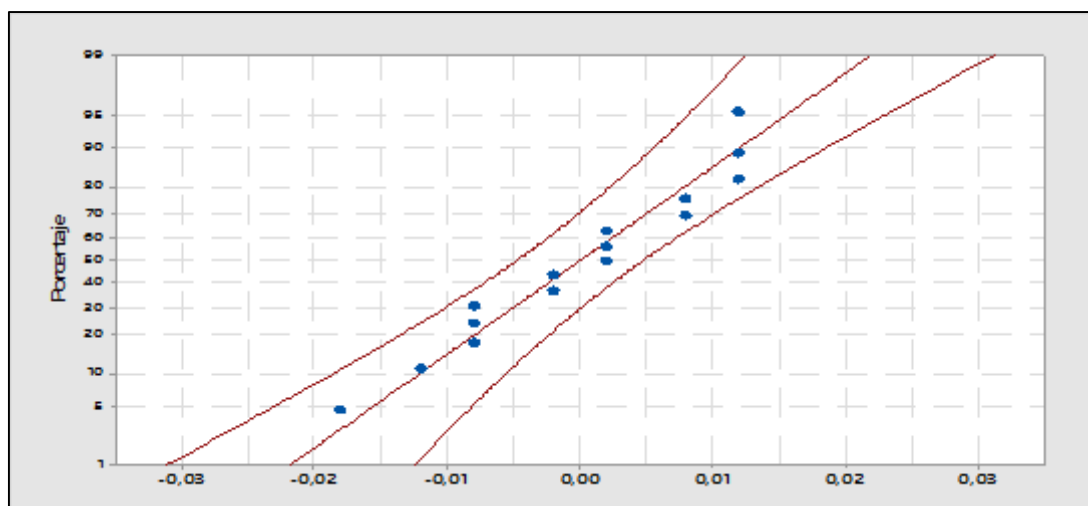


Gráfico 4-3: Estadístico de prueba de Normalidad para los resultados HPLC de las concentraciones de Riboflavina de las fermentaciones.

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

3.3.1.2. Conclusión Prueba de Normalidad

A un nivel de significancia del 5% se puede concluir que no existe evidencia suficiente para rechazar H_0 por lo que concluimos que las concentraciones de Riboflavina de las Fermentaciones son normales.

3.3.2 Prueba de homogeneidad de las concentraciones de riboflavina de las fermentaciones.

Para realizar esta prueba se utilizó el Test de Levene, es una prueba estadística inferencial utilizada para evaluar la igualdad de las varianzas para una variable

3.3.2.1. Planteamiento de hipótesis.

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2$$

$$H_a: \sigma_i^2 \neq \sigma_j^2, \text{ para } i \neq j; i, j = 1, 2, 3$$

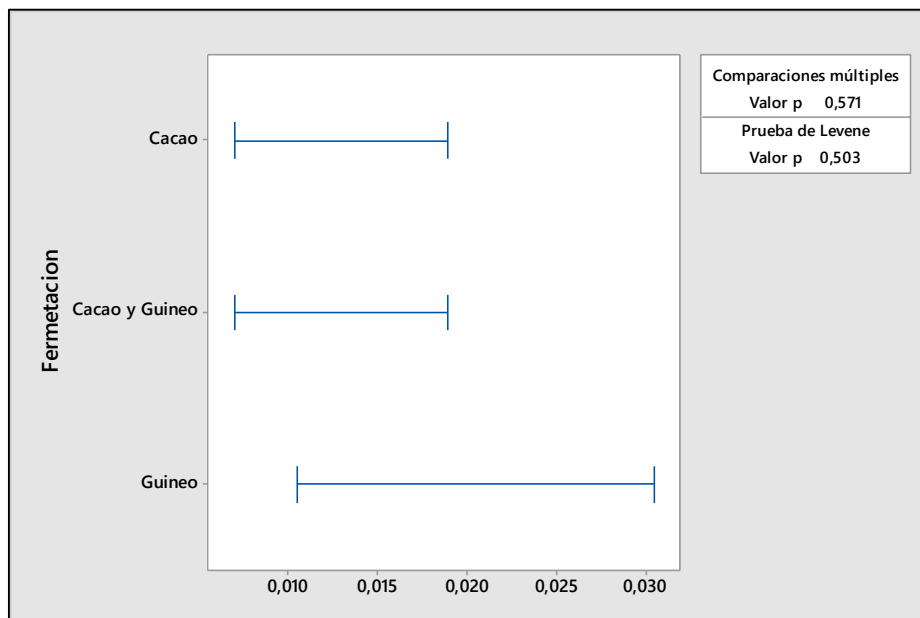


Gráfico 5-3: Prueba de homogeneidad de las concentraciones de riboflavina de las fermentaciones.

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

3.3.2.2. Conclusión de la prueba de Homogeneidad

Existe evidencia suficiente para no rechazar la hipótesis nula (H_0) es decir que las varianzas poblacionales son estadísticamente iguales.

3.3.3 Análisis de Varianza de ANOVA para los resultados HPLC de las concentraciones de las fermentaciones.

3.3.3.1. Planteamiento de Hipótesis

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ La concentración de riboflavina en las muestras de las fermentaciones de cacao, cacao-guineo y guineo son iguales.

$H_a: \mu_i \neq \mu_j$ cuando i y j sean diferentes, $i, j = 1, 2, 3$: La concentración de riboflavina en las muestras de las fermentaciones no son iguales.

3.3.3.2. Estadístico de Prueba

Tabla 15-3: ANOVA de las concentraciones de riboflavina de las fermentaciones de residuos de cacao, cacao-guineo y guineo.

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F_0	P-valor
Fermentación	0.004853	2	0.002427	23.48	0.000
Error	0.001240	12	0.000103		
Total	0.006093	14			

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

3.3.3.3. Conclusión de la ANOVA

Al nivel de significancia de 5% se puede observar que existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula (H_0) es decir la fermentación propuesta es diferente en su concentración al menos en dos de los productos.

3.3.4 Comparación de parejas de tratamientos para los resultados HPLC de las concentraciones de riboflavina de las fermentaciones.

3.3.4.1. Planteamiento de Hipótesis

$$H_0: \mu_i = \mu_j$$

$$H_a: \mu_i \neq \mu_j$$

Donde i y j =1, 2,3

Tabla 16-3: Tabla de Tukey para Fermentaciones de residuos Cacao, cacao-guineo y guineo.

Fermentación	N	Diferencia de medias	Agrupación
Cacao	5	-0.9819	A
Guineo	5	-1.1743	B
Cacao-Guineo	5	-1.3240	B

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

Mediante la prueba de Tukey, se identifica que la media de concentración de riboflavina para la fermentación de cacao es significativamente diferente y se puede observar en el Gráfico 6-3.

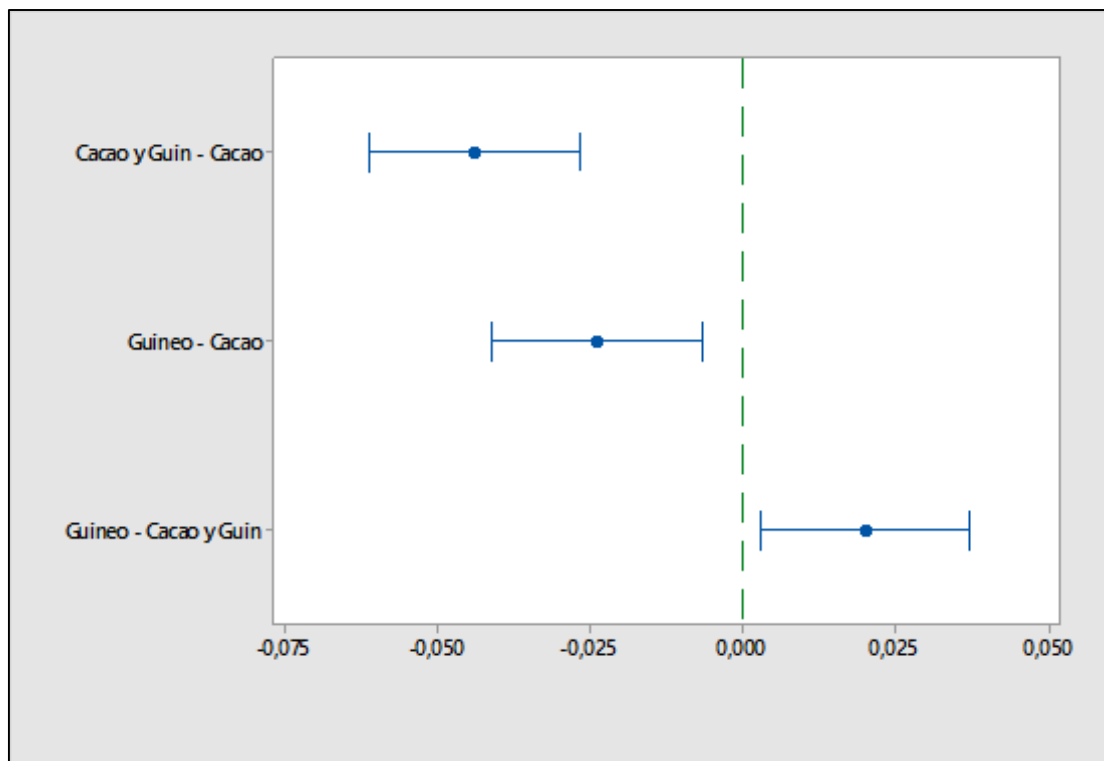


Gráfico 6-3: Prueba de Tukey para los resultados HPLC de las concentraciones de riboflavina de las fermentaciones de de residuos de cacao, guineo-cacao y guineo.

Realizado por: Moreira Diana, 2019.

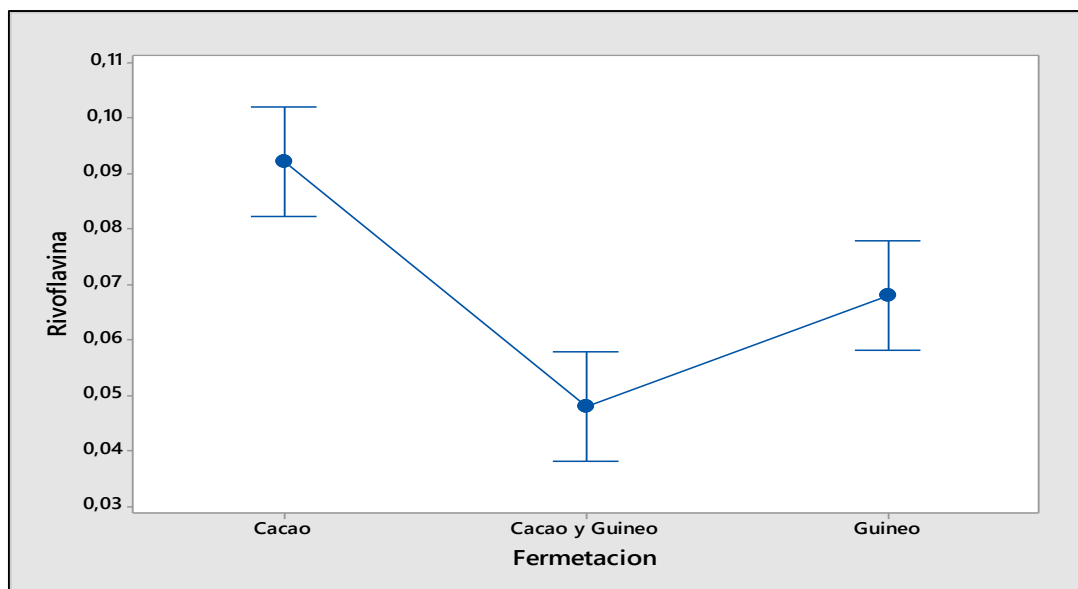


Gráfico 7-3: Prueba de diferencia de los resultados HPLC de las concentraciones de riboflavina de las fermentaciones de residuos de cacao, guineo-cacao y guineo. **Realizado por:** Moreira Diana, 2019.

A un nivel de significancia del 0.05 se rechaza H_0 , dado que el valor p es de 0.001, se concluye que existe diferencia significativa entre la concentración de riboflavina en la fermentación de los 3 productos. Se indica que la concentración de riboflavina en la muestra de cacao es significativamente superior a las otras muestras.

Como resultado de las fermentaciones se obtuvo un líquido espeso color marrón, con partículas sólidas en su interior y al analizar este líquido con las cromatografías de capa fina pudimos determinar la presencia de riboflavina en todas las fermentaciones, pero no su cantidad.

La cantidad de vitamina B_2 se pudo analizar gracias al estudio HPLC, es decir; Existe una concentración de riboflavina (mg/100g) promedio de 0.092, 0.048, 0.068 de acuerdo a la fermentación de cacao, cacao-guineo y guineo respectivamente, que es mucho menor a los valores obtenidos en experimentos relacionados con la producción de riboflavina empleando *Saccharomyces cerevisiae* y como sustrato agua de cocción de maíz enriquecido con peptona, sacarosa, glicina, aceite de canola y D-Glucosa, que dieron como resultado 13.313 mg/L durante 6 días de fermentación (Muñoz Gutiérrez D., 2016, p. 202). En tanto que, Lara, (2001), menciona que en la fermentación empleando *Ashbya gossypii* en un caldo específico preparado, obtiene 0.125µg/mL en un período de fermentación de 7 días.

CONCLUSIONES

La fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, de residuos agroindustriales es un proceso biotecnológico que permite el aprovechamiento de residuos de cacao y guineo para la obtención de vitamina B₂

Los residuos agroindustriales de cacao presentaron una humedad de 79.8%, un promedio de cenizas de 2.15% y $18 \cdot 10^{-6}$ UFC de levaduras, mientras que los residuos de guineo presentaron 1.44% de cenizas, 78.2% de humedad y $362 \cdot 10^{-3}$ UFC, valores que permitieron el correcto desarrollo de la fermentación.

Se adaptaron los fermentadores para la producción de riboflavina a nivel prototipo, éstos resultaron herramientas de fácil adquisición que se pueden emplear a nivel artesanal.

El producto obtenido de la fermentación de los residuos agroindustriales, presentó un Rf de 0,91 igual al estándar, lo que indica la obtención de riboflavina, mientras que la concentración promedio de riboflavina obtenida por medio de HPLC fue de 0.092, 0.048, 0.068 (mg/100g) en las fermentaciones de cacao, cacao-guineo y guineo respectivamente,

RECOMENDACIONES

- A nivel industrial se puede usar una cepa con mayor producción de riboflavina como *Ashbya gossypii*.
- Para aprovechar mejor los residuos agroindustriales de cacao y guineo y lograr mayor producción de riboflavina se podría enriquecer los caldos de fermentación.
- Para asegurar la presencia de la riboflavina en los fermentados, se los debe proteger de la luz solar, debido a su alta foto sensibilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ABBOTT D.**, *Introducción a la Cromatografía*. 1970. Tercera ed. Madrid: Alhambra.
2. **ALCOCER, M. A. S.** Composición química biosíntesis, actividad biológica y estructuración de lípidos y polisacáridos de *Mycobacterium*. En: *composición química biosíntesis, actividad biológica y estructuración de lípidos y polisacáridos de Mycobacterium*. 1993 Murcia: RAPID, p. 18.
3. **ANECACAO.** *Estadísticas de exportación*. [En línea], 2019, Available at: <http://www.anecacao.com/es/estadisticas/estadisticas-actuales.html> [Último acceso: 12 septiembre 2019].
4. **BALENTIĆ, J. P.** Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application. *Molecules*, 2018 pp. 2-14.
5. **BEHRMAN, R. E.** Nelson Tratado de Pediatría. En: R. M. K. H. B. J. Richard E. Behrman, ed. *Translation of Nelson Textbook of Pediatrics*, 2004., España: Elsevier, p. 182.
6. **BENÍTEZ, H. M.** Biosíntesis de ácido láctico L (+) a partir de naranja “criolla” *Citrus sinensis* en un proceso fermentativo con *Lactobacillus delbrueckii*, 2016, Volumen 11 .
7. **BENINTENDE, S.** Crecimiento Bacteriano. *Cátedra Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Pecuarias*, 2002, pp. 1-8.
8. **BROCK, T. & M. M.** *Microbiología*, 1993, Sexta ed. México: Prentice Hall Hispanoamérica S. A.
9. **BUJAN, J.** *Acenología*. [En línea], 2003, Available at: http://www.acenologia.com/noticia64_02.html
10. **CABILDO,** Fichas técnicas de cultivos de lanzarote. *Agrolanzarote*, 2012, p. 2.
11. **SUÁREZ, M. .** Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA*, 2016, pp. 20-28.
12. **CARRIÓN, K. M.**, Reutilización de residuos de la cáscara de bananos (*Musa paradisiaca*) y plátanos (*Musa sapientum*) para la producción de alimentos destinados al consumo humano.. Volumen 1.
13. **CEDAR LAKE VENTURES, INC.** *El clima promedio en Riobamba*. [En línea], 2019, Available at: <https://es.weatherspark.com/y/20020/Clima-promedio-en-Riobamba-Ecuador-durante-todo-el-a%C3%B1o> [Último acceso: Octubre 2019].
14. **CHÁVEZ, S. A.** Optimización de la producción del agente de biocontrol *Candida sake* (CPA-1), 1998, *Universitat de Lleida*, Noviembre, 1(1), p. 69.
15. **CHAZI, C.** Las vitaminas. *La granja. Revista de Ciencias de la Vida*, IV(1), 2006, pp. 51-54.

16. **CHEMISTRY OF LIFE.** *El complejo de vitamina B: Un hito químico histórico nacional.*
[En línea], 2016
Available at:
<https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/vitamin-b-complex.html>
17. **CORREDOR, Y.** Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, Vol. 14 (1) 2018, 1-14(ISSN 1900-4699), pp. 59-72.
18. **CORTEZ, G. M. R.** Estudio proximal comparativo de la cáscara y pulpa de platano (*Musa paradisiaca*) para su aprovechamiento completo en la alimentación humana y animal. 2003, p. 73.
19. **DÍAZ, J. L.,** Producción de riboflavina (vitamina B2) por *ashbya gossypii* ATCC 10895. *Universidad de Los Andes-Facultad de Ciencias-Postgrado en Biotecnología de Microorganismos*, 2001, p. 84.
20. **MINISTERIO COMERCIO EXTERIOR DE ECUADOR.** *Informe sobre el sector bananero ecuatoriano.* [En línea], 2017,
Available at: [http://panama.embajada.gob.ec/wp-content/uploads/2017/06/informe sobre el sector bananero ecuatoriano 29.05.2017 def..pdf](http://panama.embajada.gob.ec/wp-content/uploads/2017/06/informe_sobre_el_sector_bananero_ecuatoriano_29.05.2017_def..pdf)
[Último acceso: febrero 2019].
21. **ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL.** Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación.. [En línea], 2011, Universitat Politècnica de València,
Available at:
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16339/Determinaci%C3%B3n%20de%20humedad.pdf>
22. **FRANCO-CASTILLO, M.,** Reaprovechamiento integral de residuos agroindustriales: cáscara y pulpa de cacao para la producción de pectinas. */Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 2010, pp. 45-66.
23. **BLASCO, G.** Propiedades funcionales del plátano (*Musa sp*). 2014, *Rev Med UV*, 2014, p. 22.
24. **GARCÍA MARTÍNEZ, E.** *Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte..* [En línea], 2011,
Available at:
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16338/Determinaci%C3%B3n%20de%20proteinas.pdf?sequence=1>
[Último acceso: septiembre 2019].






25. **GONZÁLEZ, M. F. P.** *Manual de prácticas de los laboratorios de alimentos*. [En línea], 2015,
Available at: http://www.archivos.ujat.mx/2015/div_rios/MP-DAMR-LBR-R01.pdf
[Último acceso: septiembre 2019].
26. **GUERRERO, G.**, *Grupo "El Comercio"*. [En línea], 2013,
Available at: <https://www.revistalideres.ec/lideres/cacao-ecuadoriano-historia-empezo-siglo.html>
27. **HANS KONRAD B.** *Nutrición: texto y atlas*. 2007. 1 ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
28. **HERNÁNDEZ, A.** *Microbiología Industrial*. 2003. San José: Euned.
29. **HOMAYON AHMAD P.**, Separation of Vitamin B2 and B12 by Impregnate HPTLC Plates with Boric Acid. *Internacional Journal of Chemical and Molecular Engineering*, 2008, pp. 67-69.
30. **GAVILANES, I.**, Guía de Laboratorio de Bromatología I. *Guía de Laboratorio de Bromatología I*. 2018. Riobamba: s.n.
31. **JANOS Z.**, *Handbook of Vitamins*. Cuarta ed. United States of America: Taylor & Francis Group, 2017.
32. **JORRÍN J.** Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales*, 2008, p. 11.
33. **REVUELTA, J.**, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology Official Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2016 ISSN 1367-5435 J Issue 44.
34. **DELGADILLO, G. A.** Efectos de la deficiencia de riboflavina sobre el desarrollo del tejido dentoalveolar, en ratas. *An Fac med*, 70, 2009, ISSN 1025-5583), pp. 19-27.
35. **KALVATCHEV, Z.** *Theobroma cacao un nuevo enfoque para nutrición y salud. Agroalimentaria*, 1998, p. 23.
36. **ORTIZ K.**, Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre algunas propiedades químicas y biológicas en los suelos de una finca cacaotera, municipio de yaguará (Huila, Colombia). *Boletín científico centro de museos museode historia natural*, 2015, p. 68.
37. **LARA, J.**, Producción de Riboflavina (Vitamina B2) por *Ashbya gossypii* ATCC 10895.. *Revista de la facultad de farmacia*, 2011, Vol. 42., Volumen 42, pp. 9-13.
38. **MARINA L.** Obtención y caracterización de fibra dietaria a partir de cascarrilla de las semillas tostadas de theobroma cacao L. de una industria chocolatera colombiana. 2012, *Universidad Tecnológica de Pereira*, 1(1), p. 19.

39. **MALVIYA R**, High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2010, pp. 22-26.
40. **MANZORRO, M. S.** Diseño de una planta piloto para la obtención de bioetanol a partir de hidrolizados de residuos de girasol. *RODIN*, 2007, p. 66.
41. **BAUMANN, M**, Synthesis of Riboflavines, Quinoxalinones and Benzodiazepines through Chemoselective Flow Based Hydrogenations. *Molecules*, 2014, pp. 9736-9759.
42. **ILERA, M.**, *Vitaminas y Minerales*. 2000, Primera ed. Madrid: Editorial Complutense S. A..
43. **MARTÍN, A. R.** *Saccharomyces cerevisiae: características, morfología, ciclo vital*. [En línea], 2018, Available at: <https://www.lifeder.com/saccharomyces-cerevisiae/> [Último acceso: 17 Septiembre 2019].
44. **MEDINA, M.**, *Cuantificación del porcentaje de grasa cruda, extracto lipídico, extracto etéreo o fracción lipídica*. [En línea], 2017, Available at: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/mmedina/archivos/Practica9.pdf> [Último acceso: Septiembre 2019].
45. **MEJÍA, C. A. B.**, Fermentación sumergida en medio de producción de agua de cocimiento de maíz y aceite de soya utilizando como microorganismo productor *Saccharomyces cerevisiae*. 2018, Volumen 5, p. 115.
46. **MONTGOMERY**, *Diseño y Análisis de Experimentos*, 2004, Segunda ed. Arizona: LIMUSA WILEY.
47. **MORENO, M.** . *Manual del Biogas*. [En línea], 2011, Available at: <http://www.fao.org/3/as400s/as400s.pdf> [Último acceso: Septiembre 2019].
48. **MUÑOZ G.**, Biosíntesis de vitamina b2 a partir del agua de cocimiento del maíz utilizando como microorganismo fermentador *Saccharomyces cerevisiae*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2016, 1(1), pp. 202-2016.
49. **BOTERO, N.**, Extracción de polifenoles totales asistida por enzimas, a partir de residuos de la industria del cacao. *Agronomía Colombiana Suplemento*, 2016, p. 622.
50. **NEIRA, R.** *Fermentaciones industriales*. [En línea], 2012, Available at: https://unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/IF_MAYO_2012/IF_BAILON%20NEYRA_FIPA.pdf
51. **DOSTERT,N.** Hoja Botánica: Cacao. 2012, *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 1(1), p. 3.
52. **ORTIZ, R.** Applying life cycle management of colombian cocoa production. *Food Science and Technology (Campinas)*, 2014, pp. 62-68.
53. **OLMEDO, E. C.** Producción industrial de vitaminas con hongos. *Departamento de Genética y Enotecnia.*, 2018, *Universidad de Sevilla.*, pp. 16-21.

54. **QUINTERO, G. I. P.**, Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. *Cenicafé*, 2010.
55. **ESCOBAR, R.**, *Catálogo de maquinaria para procesamiento de cacao*. [En línea], 2013, Available at: [https://energypedia.info/images/0/08/Maquinaria para Cacao.pdf](https://energypedia.info/images/0/08/Maquinaria_para_Cacao.pdf) [Último acceso: 11 septiembre 2019].
56. **RAMÍREZ, N. B.**, Aprovechamiento de la cáscara de cacao y su contenido de pectina en la preparación de mermeladas de tipo comercial. 2014, Volumen 1, pp. 36-52.
57. **RAMÍREZ, L.** Los residuos orgánicos como alternativa para la alimentación en porcinos. *Rev. Cienc. Agr*, 2017, pp. 107-124.
58. **RUÍZ-LEZA, H. A. et al.**, . Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 2007, pp. 33-40.
59. **RUIZ, V. M.**, *Bioquímica de los Procesos Metabólicos*. 2007, Segunda ed. México: Editorial Reverté .
60. **SOLAN, H.**, Bananas as underutilized fruit having huge potential as raw materials for food and non-food processing industries: A brief review. *The Pharma Innovation Journal*, 2018., pp. 574-580.
61. **SIPSA**, El cultivo del plátano (*Musa paradisiaca*), un importante alimento para el mundo. *Boletín mensual: Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria*, 2014, p. 1.
62. **SOUSA, B. A. D. A.** Biotechnological Reuse of Fruit Residues as a Rational Strategy for Agro-industrial Resources. 2010, pp. 104-112.
63. **STAHMANN, K. -P.**,. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. 2000, p-53
64. **TARTRAKOON, T., et al.** he nutritive value of banana peel (*Musa sapientum* L.) in growing pig.. *Proceedings of the Deutscher Tropentag*, 1999, pp. 1-4.
65. **TIKKANEN, A.**, *Thin-layer chromatography*. [En línea], 2019, Available at: <https://www.britannica.com/science/interface-physics> [Último acceso: 18 Septiembre 2019].
66. **VALBUENA, K. L. O.**, Efecto del Vertimiento de Subproductos del Beneficio de Cacao sobre algunas Propiedades Químicas y Bilógicas en el Suelo de una Finca Cacaotera, Municipio de Yaguará (Huila). 2013, *Universidad de Manizales*, 1(1).
67. **VANDAMME, E. J.** Producción de vitaminas, coenzimas y productos bioquímicos relacionados mediante procesos biotecnológicos, 1992, Volumen 53, pp. 313-327.
68. **VILLAVICENCIO**. *catálogo materias primas alternativas como insumos potenciales para la elaboración de alimentos para acuicultura*. [En línea], 2016,

ANEXOS

ANEXO A: Caracterización de los residuos agroindustriales de Cacao y Guineo.

			
Determinación de cenizas y humedad		Determinación de proteínas	
			
Determinación de UFC en PCA		Determinación de hongos y levaduras en medio Saboraud	
			
Determinación de grasas			

ANEXO B: Fermentación de los Residuos Agroindustriales de cacao y guineo.



Fermentación de los residuos agroindustriales de cacao.



Fermentación de los residuos agroindustriales de cacao- guineo.





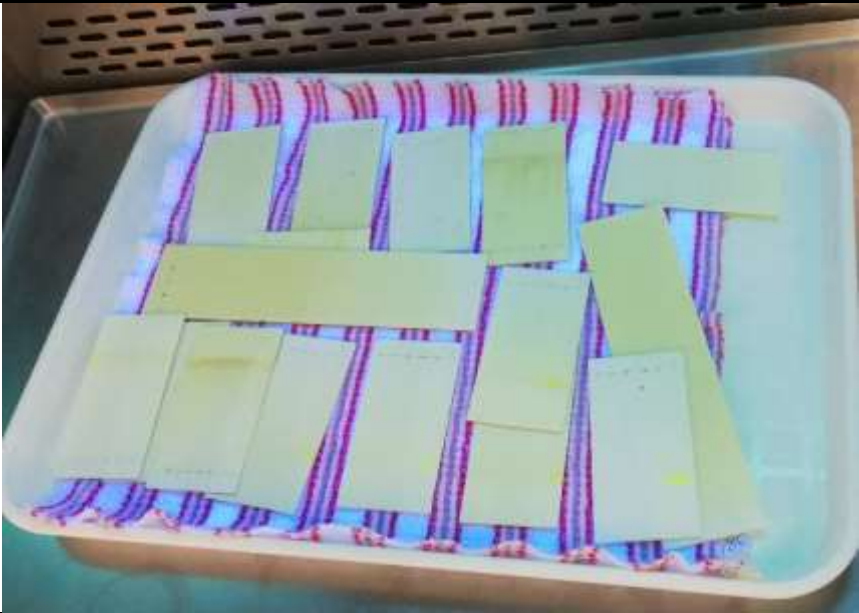


Fermentación de los residuos agroindustriales de guineo



Resultado de la fermentación de cacao.

ANEXO C: Análisis de los Resultados de la Fermentación de cacao, cacao- guineo y guineo.

	
<p>Recolección de muestras de fermentación.</p>	<p>Placas de conteo de levaduras de las fermentaciones, en agar Sabouraud.</p>
	
<p>Realización de cromatografía en capa fina de las fermentaciones.</p>	<p>Placas de cromatografía en capa fina en una cuba, sumergidos en el eluyente.</p>
	
<p>Cromatogramas en capa fina de las fermentaciones.</p>	

ANEXO D: Resultados HPLC de las Fermentaciones.



Análisis de laboratorio, HPLC de riboflavina de la fermentación de cacao.

Cromatograma del HPLC de riboflavina de la fermentación de cacao.



Análisis de laboratorio, HPLC de riboflavina de la fermentación de cacao y guineo.

Cromatograma del HPLC de riboflavina de la fermentación de cacao y guineo.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS PARA EL APRENDIZAJE
Y LA INVESTIGACIÓN
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: Día / Mes / Año

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos:
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad:
Carrera:
Título a optar:
f. Analista de bibliotecas responsable: